

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado

Sistemas Fotoluminescentes:

**Arquitetura de Derivados 2,1,3-Benzotiadiazola para
Marcação Celular e Estudos de Agregados de Nanopartículas
de Carbono**

Pedro Henrique Pimenta Rocha Carvalho

Orientadores: Brenno Amaro DaSilveira Neto e Jackson Damiani Scholten

Porto Alegre, 4 de julho de 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Tese de Doutorado

Sistemas Fotoluminescentes:

**Arquitetura de Derivados 2,1,3-Benzotiadiazola para
Marcação Celular e Estudos de Agregados de Nanopartículas
de Carbono**

Pedro Henrique Pimenta Rocha Carvalho

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Química

Orientadores: Brenno Amaro DaSilveira Neto e Jackson Damiani Scholten

Porto Alegre, 4 de julho de 2019.

“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Basta ser sincero e desejar profundo
Mas sonho que se sonha junto é realidade
Nunca se vence uma guerra lutando sozinho”

Raul Seixas

Lista de Publicações durante o período de Tese.

Publicações Relacionadas à Tese

(1) Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Paiva, K. L. R.; Baril, M.; Machado, D. F. S.; Scholten, J. D.; de Souza, P. E. N.; Veiga-Souza, F. H.; Spencer, J.; Neto, B. A. D. When the strategies for cellular selectivity fail. Challenges and surprises in the design and application of fluorescent benzothiadiazole derivatives for mitochondrial staining. *Organic Chemistry Frontiers* **2019**, *6*, 2371-2384.

Material relacionado à Tese e submetido durante o período de doutoramento

(1) Pedro H. P. R. Carvalho, a., c Iago F. de Sá, a Fabiano da S. Santos, b Fabiano S. Rodembusch, b* Marcelo O. Rodrigues, d* Jackson D. Scholten, a* Brenno A. D. Neto, c* *Concentration and pH Effects Over the Photophysical Properties of Carbon Dots (C-dots): Aggregation Model and Metal Ions Interactions.*

(2) Pedro H. P. R. Carvalho, J. R. C., Karen L. R. Paiva, Daniel F. S. Machado, Jackson D. Scholten, and Brenno A. D. Neto, * *Plasma Membrane Staining with a Fluorescent Benzothiadiazole Derivative*

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo apoio, força e amor para seguir nessa jornada. Agradeço aos colegas de bancada, Gabi, Iago, Michele, Nati e Zahid pela força de todo dia. À Bruna pelo companheirismo. Adão pela parceria e caronas. Aos funcionários do IQ-UnB e IQ-UFRGS pela ajuda nos experimentos e trocas de experiências. À Zenaide, Seu Zé e Seu Edison pelo carinho de todo dia. Ao Lucas pelas conversas sempre construtivas e valorosas. Agradeço à Sociedade dos Cabritos Secretos, amigos de graduação e início desta jornada, Daniel, Elias, Bahia, Cuia, Nareba, Ítalo, Dudu, Anão, Alemão, D2, Pedro, Ieri, Saulo, Vitor Honorato, Harry, Billy, João, Thiago e Vinny. Os amigos do Laquimet, Thyago, Gi, Haline, Luciana, Marcelão, Alberto e Gabriel. Aos amigos do Namastê e os Orgonautas que me deram forças em momentos difíceis. À Duda e ao Deonildo, grandes amigos. Ao grande amigo Lucas Tadioto por todo o apoio e ensinamentos nessa Porto Alegre.

Agradeço a Alexandra Elbakyan pela coragem e espírito rebelde na criação do Sci-HuB.

Ao Fabiano Silveira pela força e troca de experiências.

Agradeço ao Professor Fabiano Rodembusch, pela colaboração científica e pelo apoio essencial para o desenvolvimento e continuidade deste trabalho. Ao Professor José Raimundo, Karen e Bruna pelos experimentos biológicos. Ao Professor Paulo pelos cálculos teóricos. Ao Professor Marcelo Rodrigues Cabra pelas discussões muito construtivas.

Aos professores que colaboram ativamente para manutenção e melhora do prédio do Laboratório de Catálise Molecular, em especial o professor Jairton Dupont. Ao Professor Jackson Scholten por me orientar e acolher em seu laboratório. Ao Professor Brenno Neto por ter me acompanhado, incentivado e orientado por todos esses anos, desde o início dessa jornada.



Resumo

A presente tese trata sobre sistemas fotoluminescentes e suas aplicações em tecnologias de luz. O primeiro capítulo descreve o planejamento da arquitetura e a aplicação de pequenas moléculas orgânicas derivadas do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD) como sensores fluorescentes para experimentos de imageamento celular. Os compostos foram planejados de modo que apresentassem seletividade por determinada organela de acordo com suas características estruturais, como carga iônica, solubilidade e presença de grupos funcionais, criando uma relação entre as características de suas estruturas e a organela alvo de marcação. Os resultados obtidos mostram a necessidade de mais estudos nessa área, uma vez que as relações obtidas foram diferentes do esperado. Dentre os compostos testados um apresentou seletividade por mitocôndrias e outro pela membrana plasmática. Experimentos de co-marcação foram realizados para a confirmação destes resultados. Análises de EPR demonstraram que o composto fluorescente não leva à formação de espécies reativas de oxigênio no interior das células, não afetando o metabolismo destas. O segundo capítulo discorre sobre nanopartículas de carbono fluorescentes, C-dots. Sua síntese, caracterização, estudos de propriedades fotoluminescentes, estudo de suas propriedades de agregação em solução são apresentados. Os C-dots obtidos neste trabalho apresentaram propriedades fotoluminescente sem precedente na literatura, com comportamento inédito em diferentes condições de pH e concentração. Suas emissões foram estudadas também em solução na presença de diferentes íons metálicos, afim de se verificar o efeito que a distribuição eletrônica e a carga destes teriam na emissão das partículas. Os experimentos revelaram também o efeito do ambiente químico nas propriedades de agregação, tamanho de partícula e potencial de carga de superfície. Com base nos resultados obtidos, um modelo de estrutura para essas partículas foi proposto para explicar o comportamento observado.

Abstract

This work describes photoluminescent systems and their applications in Bioimaging experiments and light technologies. In the first chapter, small molecules 2,1,3-benzothiadiazole (BTD) derivatives (neutral, singly-charged and doubly-charged) were planned to elucidate the relationship between the molecular architecture and the selectivity inside the cells. The compounds were designed in a way that they presented preference for a specific organelle according to their molecular features such as ionic charge, solubility and the presence of functional groups, creating a relationship between the chemical structure and the biological target. The results obtained showed a need for new strategies, since the ones tested did not bring the expected outcomes. One of the derivatives stained mitochondria selectively another one stained the plasma membrane in an unexpected manner. Co-staining experiments confirmed the cellular localization of the new derivatives. EPR experiments demonstrated the fluorescent marker does not interfere in the production of reactive oxygen species inside the cells. The second chapter describes carbon nanoparticles, C-dots. Synthesis, characterization, investigation of its photophysical and aggregation properties were carried. The C-dots structure was characterized by IR, XPS, TEM, NMR. The nanoparticles presented unprecedented photoluminescent behavior that could be tuned by pH and solution concentration. Photoluminescent experiments were also conducted in the presence of metallic ions as a mean to investigate C-dots electron donation capability and how the electron distribution of the ion could influence the C-dots photoluminescence.

Sumário

CAPÍTULO 1	1
COMPOSTOS FLUORESCENTES E APLICAÇÕES	1
CAPÍTULO 2	7
MARCADORES FLUORESCENTES DERIVADOS DO NÚCLEO BTD	7
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1.1 BENZOTIADIAZOLAS	8
1.2 PLANEJAMENTO PARA MARCAÇÃO SELETIVA	14
2 OBJETIVOS	17
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	18
3.1 SÍNTESE	19
3.2 PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS	20
3.3 CÁLCULOS TEÓRICOS	25
3.4 EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS	30
3.4.1 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	30
3.4.2 EXPERIMENTOS DE BIOIMAGEAMENTO	31
3.5.2 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	39
4 CONCLUSÃO	41
CAPÍTULO 2	42
NANOPARTÍCULAS DE CARBONO	42
1 INTRODUÇÃO	43
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	45
2.1 NANOESTRUTURAS DE CARBONO.....	45
2.2 NANOPARTÍCULAS DE CARBONO. <i>CARBON DOTS VS GRAPHENE DOTS</i>	46
2.2 MÉTODOS DE SÍNTESE	47
2.3 MODIFICAÇÃO DOS C-DOTS.....	48
2.4 REDUÇÃO DE SUPERFÍCIE	49
2.5 FOTOLUMINESCÊNCIA DOS C-DOTS	51
2.6 FORMAÇÃO DE AGREGADOS	53
2.7 BIOIMAGEAMENTO	54
2.8 APLICAÇÕES FOTOCATALÍTICAS	55
2.8.1 <i>WATER SPLITTING</i>	55
2.8.2 FOTOCATÁLISE ORGÂNICA	56
3 OBJETIVOS	58
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS <i>CARBON DOTS</i>	59
4.2 TITULAÇÃO	66
4.3 PROPRIEDADES FOTOLUMINESCENTES.....	68
4.3.1 EFEITO DO PH	71
4.3.2 FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO.....	76

4.4 ESTUDO DE AGREGAÇÃO	78
4.4.1 LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO.....	81
4.5 ESTUDO COM ÍONS METÁLICOS	83
4.5.1 FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO NA PRESENÇA DE METAIS	89
4.5.2 ESTUDO DO EFEITO <i>QUENCHING</i>	92
4.5.2 ESTUDO DO MATERIAL PRECIPITADO	95
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	98
CAPÍTULO 4.....	99
SESSÃO EXPERIMENTAL	99
1 EXPERIMENTAL	100
1.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS BTDS.....	104
1.3 BIOIMAGEAMENTO.....	112
1.4 SÍNTESE DO C-DOTS	116
1.5 DADOS CHN	116
1.6 ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA	116
1.7 ESPECTROS DO MATERIAL PRECIPITADO	122
REFERÊNCIAS	123

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplos de pequenas moléculas orgânicas e nanoestruturas de carbono fluorescentes (adaptado das referências 11 e 12.....	3
Figura 2. Célula visualizada em um microscópio (a), não é possível distinguir as organelas devido à falta de contraste. A mesma célula, agora com o contraste gerado pelos sensores fluorescentes (b) (imagem adaptada ³⁰).....	5
Figura 3. Estrutura do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD).	8
Figura 4. Estruturas dos derivados BTD sintetizados e testados em aplicações biológicas pelo grupo desde 2007.	11
Figura 5. Derivados BTDs sintetizados por outros grupos e testados como sondas fluorescentes.	13
Figura 6. Marcadores comerciais brometo de etídio (seletivo para dsDNA) e MitoSOX (seletivo para mitocôndrias).	16
Figura 7. Derivados BTDs sintetizados e testados como possíveis marcadores neste trabalho..	19
Figura 8. Espectros de UV-Vis, fluorescência e efeitos solvatocrômicos das BTDs. (a) BTD-4AP , (b) BTD-4APOc , (c) BTD-4APBu , (d) BTD-4APBuP . Todas as análises foram realizadas em solução a 10 μ M.	22
Figura 9. Modelo de interação proposto entre as moléculas de água e o composto BTD-4AP ..	24
Figura 10. Geometrias otimizadas das estruturas BTD-4AP (neutra), BTD-4APBu (catiônica), BTD-4APBuP (dicatiônica) e BTD-4APOc (catiônica), no vácuo obtidas por meio de cálculos com nível CAM-B3LYP/6-31G(d).....	25
Figura 11. Espectros de absorção simulados dos derivados BTDs em diferentes solventes calculados com níveis de teoria PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31G(d).....	28
Figura 12. Orbitais dos derivados BTD-4AP , BTD-4APBu , BTD-4APBuP e BTD-4APOc em acetonitrila, envolvidos nas transições $S_0 \rightarrow S_1$ calculados com PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31G(d).	29
Figura 13. Viabilidade celular determinada por análises de MTT. O gráfico mostra que nenhum efeito citotóxico significativo é observado em concentrações de 10 μ M após 24 horas. Em concentrações de 100 μ M, no entanto, todos os compostos são citotóxicos. Valores de P: *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001.....	30
Figura 14. Semelhança estrutural das moléculas BTD-APBr , BTD-APH e BTD-4APBr com o composto BTD-4AP	31
Figura 15. Representação esquemática do planejamento das arquiteturas moleculares para gerar maior direcionalidade a partir do composto BTD-4APBu	32
Figura 16. Perfil de fluorescência de células MCF-7 incubadas com BTD-4APOc (1 μ M) (A) e (C) células vivas, (B) e (D) células fixadas. (A) e (C) apresentam a distribuição de marcação no citoplasma com acumulação nas regiões próximas aos núcleos, indicadas pelas setas brancas (mitocôndrias). Os núcleos nessas imagens são indicados pela letra N. (B) e (D) apresentam as mesmas imagens, no entanto sem excitação dos corantes. Barra de escala é de 10 μ m.	33
Figura 17. Experimentos de co-marcação utilizando MitoTracker Red (emissão no vermelho) e BTD-4APOc (emissão no verde) em células MCF-7. (A) Mitocôndria marcada com BTD-4APOc . (B) Sobreposição de (A) e (C) com emissão no laranja, como resultado da sobreposição	

do verde e vermelho. (C) Mitocôndrias marcadas com MitoTracker Red. (D) Morfologia normal das células sem excitação de fluorescência.	34
Figura 18. Experimentos de co-marcação utilizando MitoTracker Red (emissão no vermelho) e BTD-4APOc (emissão no verde) em células fixadas MCF-7. (A) Mitocôndria marcada com BTD-4APOc . (B) Células fixadas com MitoTracker Red. Nenhuma fluorescência é observada. (C) Apresenta a morfologia normal das células no microscópio, sem nenhuma excitação. A letra N indica os núcleos da célula. A barra de escala é de 10 μM	35
Figura 19. Perfil de fluorescência das células MCF-F incubadas com o composto BTD-4APBuP (1 μM) em células vivas (A) e (C) e fixadas (B) e (D). (A) e (C) apresentam a distribuição de marcação do BTD-4APBuP na membrana plasmática. Os indicados pelas letras (B) e (D) apresentam imagens da morfologia normal das células sem excitação de fluorescência. A letra N indica os núcleos da célula. A barra de escala é de 10 μM	37
Figura 20. Experimentos de co-marcação utilizando o marcador comercial Cell Mask (emissão em vermelho) e BTD-4APBuP (emissão em verde) em (i) células vivas MCF-7 e (ii) células fixadas. (A) Membrana plasmática marcada com BTD-4APBuP . (B) Sobreposição de (A) e (C) mostrando a emissão em amarelo como resultado da mistura do verde e vermelho. (C) Membrana plasmática marcada com o CellMask . (D) Apresenta a morfologia das células no contraste normal do microscópio. As setas indicam a acumulação periférica das sondas na membrana. Barra de escala 10 μm	38
Figura 21. Efeitos da menadiona, <i>N</i> -acetilcisteína (NAC) e BTD-4APOc na formação de CM^* nas células tumorais. A maior concentração de CM^* foi observada em células MCF-7 ($p < 0,01$) com menadiona.	40
Figura 22. Exemplos de nanoestruturas grafênicas (imagem adaptada da referência ⁹⁹).....	44
Figura 23. Linha do tempo da descoberta dos materiais membros da classe dos carbonáceos nanométricos.	45
Figura 24. Exemplo de processo de redução de superfície do óxido de grafeno (adaptada referência ¹³⁴).	50
Figura 25. Representação da proposta esquemática da estrutura dos aglomerados dos C-dots (Imagem adaptada da referência ¹⁵³).....	54
Figura 26. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (a) 120 kV e (b) 200 kV dos C-dots sintetizados.	60
Figura 27. Espectro de IV do material de partida Carvão Ativo (preto) e do produto final, <i>Carbon Dots</i> (vermelho).	61
Figura 28. Espectros de XPS dos <i>Carbon Dots</i> (vermelho) e do carvão ativo (preto) (a). Espectros de Alta Resolução do C 1s dos <i>Carbon dots</i> (vermelho) e do carvão ativo (preto) (b). Espectros de alta resolução deconvoluídos de C 1s (c) e O 1s (d).	62
Figura 29. Espectro de APT (100 MHz) dos <i>Carbon Dots</i> em $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$	64
Figura 30. Estrutura genérica proposta para os <i>Carbon Dots</i>	65
Figura 31. Curva de titulação dos <i>Carbon Dots</i> (preto) e sua derivada (azul) (a). Expansão da curva de titulação indicando os pontos de inflexão obtidos por meio da primeira derivada.	66
Figura 32. Proposta de sequência de ionização para os <i>Carbon Dots</i> em diferentes valores de pH de acordo com os valores de pK_a obtidos.	67

Figura 33. (a) Espectro de UV-Vis dos <i>Carbon Dots</i> em solução aquosa em diferentes concentrações (15-25 ppm). O <i>inset</i> apresenta a ampliação da região de 280-400 nm na concentração de 25 ppm. (b) Emissão de fluorescência normalizada em diferentes comprimentos de onda de excitação, 400-550 nm. (c) Gráfico da excitação (λ_{ex}) vs. máximo de emissão (λ_{em}) (preto) e intensidade de fluorescência (azul).	69
Figura 34. Absorbância (a) e Intensidade de Fluorescência (b) em diferentes condições de pH. (b) Gráfico do pH vs. posição do máximo de emissão (λ_{em}) (preto) e Intensidade de Fluorescência (azul). Espectros medidos com excitação em 340 nm.	72
Figura 35. (a) Espectros de emissão normalizados dos <i>Carbon Dots</i> em diferentes concentrações [770 ppm a 40 ppm]. (b) Gráfico da concentração (ppm) vs. posição do máximo de emissão (preto) e intensidade de fluorescência (azul). A intensidade foi medida no máximo de emissão de cada curva. Os espectros foram obtidos com excitação em 300 nm.	74
Figura 36. Espectro de emissão de fluorescência resolvida no tempo dos C-dots em diferentes soluções. IRF = <i>Instrument Response Function</i>	77
Figura 37. Análises de DLS (linha azul ▲) e de potencial Zeta (linha preta ●) dos <i>Carbon Dots</i> em função do pH. Todas as análises foram realizadas na concentração de 16 ppm.	78
Figura 38. Proposta de dinâmica de agregação para os <i>Carbon Dots</i> em diferentes condições de pH.	79
Figura 39. Raio hidrodinâmico dos <i>Carbon Dots</i> em solução aquosa (pH 5,5) em diferentes concentrações (a). Representação esquemática da distribuição das partículas em solução dependendo da concentração (b).	80
Figura 40. Espectro de fluorescência dos C-dots em diferentes solventes a 16 ppm, com excitação em 300 nm (a). Representação esquemática da distribuição das partículas em solução dependendo do tipo de solvente (b).	82
Figura 41. (a) Não ocorrência do efeito Tyndall em soluções contendo apenas C-dots. (b) Demonstração da ocorrência do efeito Tyndall em soluções de C-dots na presença de íons metálicos.	84
Figura 42. Intensidade de fluorescência dos C-dots em 500 nm em soluções com 160 μ M dos íons metálicos em água deionizada. Excitações foram realizadas em 300 nm.	85
Figura 43. Espectros de absorção dos íons metálicos (preto), dos C-dots (16 ppm) (azul), e dos C-dots na presença dos íons (vermelho).	86
Figura 44. Proposta de interação dos C-dots com os íons metálicos. (a) C-dots agregados. (b) Interação inicial dos C-dots com os íons. (c) Desagregação causada pela interação com os íons.	87
Figura 45. Gráficos dos experimentos de Titulação Espectrofluorimétrica dos C-dots na presença dos íons metálicos: (a) Na^+ , (b) Au^+ , (c) Fe^{3+}	89
Figura 46. Espectro de emissão de fluorescência resolvida no tempo dos C-dots (16 ppm) na presença de 160 μ M dos cátions metálicos. IRF = <i>Instrument response Function</i>	89
Figura 47. Gráficos de Stern-Volmer dos C-dots na presença de diferentes cátions metálicos. (a) Curva linear. (b) Curvas não lineares.	92
Figura 48. Espectro de IV do material do precipitado da solução contendo C-dots e íons de Fe^{3+}	96

Figura 49. Imagens de microscopia de transmissão (200 kV) precipitado da solução contendo C-dots e íons de Fe^{3+} . (b) Imagem do espectro de EDS da região a. (c) Imagem do espectro de EDS da região b.	97
Figura S1. ^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do BTD-4AP	106
Figura S2. RMN ^{13}C (APT, 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do BTD-4AP	106
Figura S3. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon [BTD-4AP + H]⁺	107
Figura S4. RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) do BTD-4APBu	107
Figura S5. RMN ^{13}C (APT,100 MHz, CDCl_3) do BTD-4APBu	108
Figura S6. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon [BTD-4APBu]⁺	108
Figura S7. RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do BTD-4APOc	109
Figura S8. RMN ^{13}C (APT,100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do BTD-4APOc	109
Figura S9. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon [BTD-4APOc]⁺	110
Figura S10. RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do BTD-4APBuP	110
Figura S11. RMN ^{13}C (APT, 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do BTD-4APBuP	111
Figura S12. RMN ^{31}P (161 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, H_3PO_4 como referência de 0.0 ppm) do BTD-4APBuP	111
Figura S13. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon [BTD-4APBuP]²⁺	112
Figura S14. Células tumorais MCF-F marcadas com BTD-4AP (1 μM). (A) e (B) células vivas. (C) e (D) células fixadas. Um sinal fluorescente não específico é observado no citoplasma das células em ambas as amostras. A letra N indica o núcleo das células. Barra da escala de 10 μm	112
Figura S15. Células tumorais A2780 marcadas com BTD-4APBu (1 μM). (A) e (B) células vivas. (C) e (D) Células fixadas. Observe a acumulação no citoplasma (setas brancas) em uma região próxima ao núcleo das células em ambas as amostras, uma região rica em mitocôndrias. A letra N indica o núcleo das células. Barra da escala de 10 μm	113
Figura S16. Coeficiente de correlação de Pearson obtido a partir de 10 imagens dos experimentos de bioimageamento com células MCF-7 marcadas com BTD-4APOc . O gráfico de dispersão à esquerda está de acordo com os resultados ordinários da regressão dos mínimos quadrados. A imagem no centro apresenta o PCC das imagens com os respectivos controles negativos. Os dados à direita são os valores de PCC para cada uma das imagens e os valores com rotação de 90°.	114
Figura S17. Resultados dos experimentos de EPR para se avaliar a formação das espécies ROS formadas no meio intracelular.	115
Figura S18. Emissão de fluorescência das bandas de absorção, localizadas em 227, 290 e 370 nm, observadas no espectro de UV-Vis.	116
Figura S19. Absorbância vs comprimento de onda. À direita solução dos C-dots com os íons, à esquerda espectros dos cátions em solução. Li^+ (A), Mn^{2+} (B), Au^+ (C), Na^+ (D), Zn^{2+} (E), Al^{3+} (F), Fe^{3+} (G), Co^{2+} (H), In^{3+} (I), Ru^{3+} (J), Os^{3+} (K), Cu^{2+} (L), Ni^{2+} (M), Ag^+ (N), Pd^{2+} (O).....	118
Figura S20. Intensidade de fluorescência vs comprimento de onda. Li^{+c} (A), Mn^{2+} (B), Au^{+c} (C), Na^+ (D), Zn^{2+c} (E), Al^{3+c} (F), Fe^{3+c} (G), Co^{2+c} (H), In^{3+c} (I), Ru^{3+c} (J), Os^{3+} (K), Cu^{2+} (L), Ni^{2+} (M), Ag^+ (N), Pd^{2+} (O).	121
Figura S21. Gráficos de Stern-Volmer dos C-dots na presença de diferentes cátions metálicos, curva sem inclinação.	121

Figura S22. Espectros de IV dos C-dots em preto e dos compósitos C-dots com íons metálicos em vermelho. (a) Na^+ , (b) Ag^+ , (c) Ni^{2+} , (d) Ru^{3+} 122

Lista de Esquemas.

Esquema 1. Diagrama de Jablonski simplificado (adaptado das referências 3 e 4).	2
Esquema 2. Síntese dos derivados BTDs.	20
Esquema 3. Processos <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> para síntese dos carbon dots.	47
Esquema 4. Processo <i>top-down</i> para síntese dos <i>Carbon Dots</i> com ácido nítrico.....	59

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados fotofísicos para os compostos BTDs em diferentes solventes (todas as soluções foram medidas com concentração de 10 μM).	21
Tabela 2. Dados experimentais e teóricos dos comprimentos de onda de absorção dos compostos BTD-4AP , BTD-4APBu , BTD-4APBuP e BTD-4APOc obtidas com cálculos TD-DFT utilizando nível de teoria 6-311+G(2d,p).	26
Tabela 3. Exemplos de materiais precursores usados na síntese de C-dots.	48
Tabela 4. Métodos de obtenção, precursores de C-dots e resultados em experimentos de Bioimageamento.	55
Tabela 5. Dados relevantes de Fluorescência Resolvida no Tempo para os C-dots em diferentes condições de pH e concentração, em que τ é o tempo de vida da fluorescência (em ns) e τ_{av} é a média dos tempos de vida. Os números 1 e 2 são relativos aos diferentes decaimentos observados.	77
Tabela 6. Dados fotofísicos dos C-dots em diferentes solventes	83
Tabela 8. Dados do método de Stern-Volmer para os C-dots na presença de diferentes cátions, em que K_{SV} é a constante (a 10^3 M^{-1}) de Stern-Volmer, K_q é a constante de <i>quenching</i> bimolecular (a $10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e R é o coeficiente de determinação.	94

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

APT: *Attached Proton Test*

CA: Carvão Ativo

C-dots: *Carbon Dots*

IV: Infravermelho

LIs: Líquidos Iônicos

ESI-HRMS: *Electrospray Ionization – High Resolution Mass Spectrometry*

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

XPS: *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*

DLS: *Dynamic Light Scattering*

IRF: *Instrument Response Function*

PET: *Photoinduced electron transfer*

IFE: *Inner filter effect*

TFF: Trifenilfosfônio

ROS: *Reactive Oxygen Species*

LED: *Light Emitting Diode*

HOMO: *Highest Occupied Molecular Orbital*

LUMO: *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

PCC: *Pearson's Correlation Coefficient*

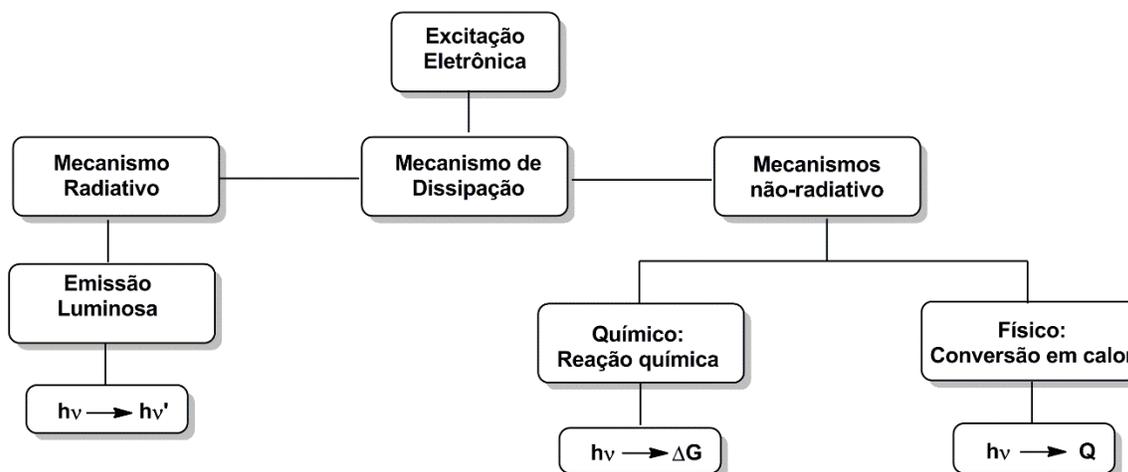
Capítulo 1

Compostos Fluorescentes e Aplicações

Materiais Fotoluminescentes

Materiais luminescentes são aqueles que convertem energia absorvida na emissão espontânea de radiação eletromagnética na região do UV, visível e regiões do infravermelho em luz.¹ A maneira como é dada a excitação destes materiais irá determinar o tipo de luminescência a ser estudado. A eletroluminescência ocorre quando a excitação é causada por uma corrente elétrica. A termoluminescência se deve à excitação causada por calor. Existem diversas formas de excitação, neste trabalho será discutida em maiores detalhes a fotoluminescência. Esta ocorre quando há a emissão espontânea de luz por espécies químicas eletronicamente excitadas, após estas absorverem radiação visível do espectro eletromagnético.² Compostos fotoluminescentes, portanto, são aqueles que convertem a radiação eletromagnética incidente em luz.

A energia absorvida por qualquer espécie química pode ser dissipada de duas maneiras diferentes: (i) por vias não radiativas, em que a energia pode ser convertida em uma reação química ou dissipada na forma de calor por meio de vibrações e rotações das ligações químicas; ou (ii) por vias radiativas, em que a energia absorvida é emitida na forma de luz. O Esquema 1 apresenta o diagrama simplificado de Jablonski, o qual exemplifica os processos de dissipação de energia descritos.^{3,4}



Esquema 1. Diagrama de Jablonski simplificado (adaptado das referências 3 e 4).

Hidrocarbonetos aromáticos (pireno, naftaleno), fluoresceína, porfirinas, etc. são exemplos de compostos orgânicos fotoluminescentes. Compostos inorgânicos como íons de terras raras, íons de metais de transição, vidros dopados (Nd, Mn, Ce, Ag, Cu), cristais (ZnS, CdS, ZnSe, CdSe), clusters metálicos e nanotubos de carbono também apresentam propriedades fotoluminescentes.^{1,5,6} Para uma espécie química dissipar energia na forma de luz, ela deve possuir determinadas características. Entre estas, destacam-se:⁷ (i) rigidez estrutural; (ii) planaridade; (iii) ligações π -conjugadas; (iv) grupos funcionais aromáticos; (v) anéis condensados; (vi) orbitais disponíveis que permitam transições eletrônicas na faixa do visível.

Existem diversas pequenas moléculas orgânicas que possuem as características citadas acima e são utilizadas como núcleos fluorescentes na síntese de inúmeros outros compostos com as mais diversas aplicações em tecnologias de luz.⁸⁻¹⁰ Outra classe de material que também possui as propriedades desejadas para a fotoluminescência e tem chamado bastante atenção de diversos grupos de pesquisa são os nanomateriais da família do carbono.^{5,11} Na Figura 1 são apresentados alguns exemplos de núcleos orgânicos e de nanoestruturas da família do carbono que são fluorescentes.

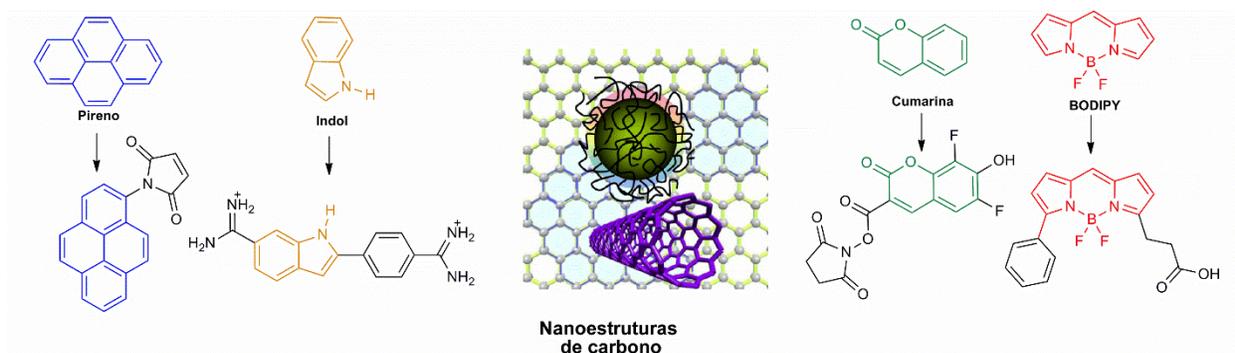


Figura 1. Exemplos de pequenas moléculas orgânicas e nanoestruturas de carbono fluorescentes (adaptado das referências 11 e 12).

Aplicações

As aplicações mais comuns para materiais luminescentes são nas tecnologias de luz,⁶ como na confecção de lâmpadas, em diodos emissores de luz (LEDs – *Light emitting diodes*) e dispositivos utilizados na emissão de raios x. São aplicados também em diversas outras áreas, como na catálise, onde são empregados como semicondutores em processos fotocatalíticos,¹³ e também em tecnologias de sensores.¹⁴

Um sensor é, por definição um dispositivo capaz de gerar um sinal luminoso como resposta ao interagir com a matéria ou energia.¹⁵ Um sensor luminescente é, portanto, um dispositivo que tem seu sinal luminoso alterado como resposta após receber um estímulo, podendo ser intensificado, suprimido ou alterado. A luminescência como ferramenta de detecção é extremamente sensível, com uma ampla variedade de aplicações,^{16,17} sendo empregada na detecção de poluentes,¹⁸ em exames clínicos na detecção de agentes biológicos,¹⁹ e também no sofisticado monitoramento de organelas celulares por meio da microscopia de fluorescência.²⁰

Bioimageamento

Bioimageamento consiste em experimentos que visualizam os processos biológicos de maneira não invasiva em tempo real.²¹ Os experimentos visam estudar o metabolismo e comportamento celular interferindo o mínimo possível nos processos vitais da célula.

A técnica utilizada nos experimentos de imageamento celular é a microscopia de fluorescência. A microscopia de fluorescência é um ramo da microscopia de luz que faz uso de compostos fluorescentes como fonte de contraste. A fonte luminosa emite um feixe de luz no visível (acima de 400 nm) com o objetivo de se excitar o fluoróforo que foi previamente inserido no interior da célula, ou acoplado a uma biomolécula específica com a finalidade de marcar um alvo em particular.²²

Uma das vantagens extraordinárias da microscopia de fluorescência é a possibilidade de observação de estruturas que se situam abaixo do limite de resolução imposto pela luz que é de cerca de 0,2 μm . Ao vermos, por exemplo, a emissão fluorescente de um fluoróforo associado a um anticorpo, indiretamente estamos vendo a

molécula a qual este anticorpo está associado, mesmo esta molécula estando fora do limite de resolução da microscopia de luz.²³

O uso de compostos luminescentes como sondas celulares impulsionou enormemente os estudos para monitorar o comportamento das células e suas organelas,²⁴⁻²⁶ permitindo o desenvolvimento de medicamentos e maior compreensão dos mecanismos do metabolismo celular.²⁷⁻²⁹ Na Figura 2 é possível observar o contraste gerado por compostos fluorescentes em um microscópio.

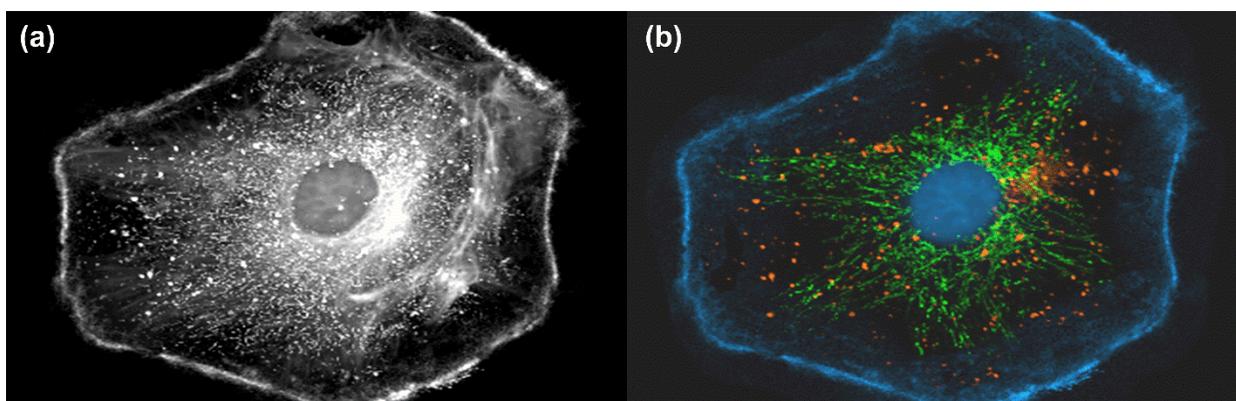


Figura 2. Célula visualizada em um microscópio (a), não é possível distinguir as organelas devido à falta de contraste. A mesma célula, agora com o contraste gerado pelos sensores fluorescentes (b) (imagem adaptada³⁰).

Apesar do amplo uso de sondas celulares como ferramenta de pesquisa, e de haver empresas voltadas para a produção e comercialização destas, muito ainda há de ser desenvolvido na área.

Alguns dos problemas enfrentados por pesquisadores da área ao utilizar os compostos disponíveis são a dificuldade para estocagem (usualmente requerem estocagem a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$), elevada instabilidade química e fotoquímica, elevada citotoxicidade, baixa seletividade (costumam não ser totalmente específicos-seletivos), um teor de impurezas significativo e um elevado custo. Além disso, em geral, são sensíveis a variações de temperatura, pH, presença de oxigênio e luz. Para superar

estes obstáculos, novos marcadores vêm sendo testados, em que diferentes estratégias³¹ são aplicadas, visando melhorar os pontos fracos dos marcadores comerciais, como suas seletividade e estabilidade.³²⁻³⁴

Existem diversos tipos de sondas fluorescentes¹⁴ que podem ser utilizadas em experimentos de estudos do meio celular. Podem ser desde de pequenas moléculas orgânicas³⁵ e complexos metálicos,³⁶ como materiais inorgânicos como os *quantum dots*³⁷ e mais recentemente as nanopartículas de carbono também tem sido testadas para desempenhar essa função.³⁸

A maior parte das moléculas utilizadas atualmente empregam núcleos fluorescentes clássicos como cumarinas, fluoresceína, rodamina, cianinas e fenoxazinas.³⁹⁻⁴¹ No entanto, as limitações destes fluoróforos, já são bem conhecidas. Desta maneira, novos heterociclos como fenazinas,⁴² quinolinas⁴³ e piridinas vem sendo testados.

Nesta linha de pesquisa, nosso grupo estuda estratégias de marcação utilizando derivados do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola. Esta tese irá tratar sobre o uso de pequenas moléculas fluorescentes e a relação que suas estruturas tem com seu comportamento e seletividade no meio intracelular. Tratará também sobre o uso de nanopartículas de carbono como potenciais sondas fluorescentes além de apresentar um estudo físico-químico sobre suas propriedades fotoluminescentes e comportamento de agregação em solução.

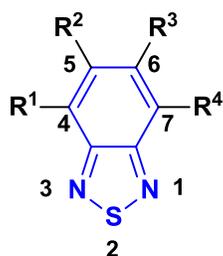
Capítulo 2

Marcadores Fluorescentes Derivados do Núcleo BTB

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Benzotiadiazolas

O núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD, Figura 3) apresenta características desejáveis para a síntese de compostos luminescentes e que podem ser aplicados como novos marcadores celulares. Dentre estas características destacam-se: (i) grupos funcionais aromáticos funcionalizáveis; (ii) planaridade e rigidez estrutural; (iii) conjugação π eficiente; e (iv) forte caráter aceptor de elétrons.



2,1,3-benzotiadiazola (BTD)

Figura 3. Estrutura do núcleo 2,1,3-benzotiadiazola (BTD).

Os derivados do núcleo BTD normalmente são sintetizados por meio de extensões das conjugações π nas posições 4 e 7, por meio de reações de acoplamento cruzado.^{44,45}

O primeiro trabalho científico sobre aplicação biológica utilizando um derivado BTD data de 2007.⁴⁶ Neste trabalho, as moléculas sintetizadas tiveram suas propriedades espectroscópicas avaliadas na presença de diferentes quantidades de dsDNA. Dentre as diversas moléculas testadas, uma apresentou (Figura 4A) variações nas intensidades e posições das bandas de emissão e absorção à medida em que a concentração do material genético aumentava. A mudança nos espectros de UV-Vis e fluorescência é indicativo da interação entre a molécula e a estrutura biológica. Apesar deste trabalho ter sido o primeiro sobre aplicação biológica utilizando o núcleo BTD, nele não foi realizado nenhum experimento de Bioimageamento. Experimentos deste tipo só viriam a ser realizados alguns anos mais tarde.

O segundo trabalho, e o primeiro com experimentos de Bioimageamento, foi publicado em 2010. Os núcleos fluorescentes, BTD e benzazol foram unidos. Dois novos compostos foram sintetizados, denominados **BTDBI** e **BTDBT** (Figura 4B), e também testados em titulações espectrofluorimétricas com dsDNA.⁴⁴ Ambos os compostos mostraram a afinidade pela biomolécula e por esta razão também foram testadas em experimentos de imageamento celular. A partir de então, novas moléculas continuaram a ser testadas como marcadores celulares, com o objetivo de se estudar o efeito que as substituições nas posições 4 e 7 teriam sobre sua seletividade e luminosidade dos novos marcadores.

Em 2012, observou-se que uma das substituições no núcleo BTD influenciaria na seletividade (Figura 4C) dentro da célula e a outra substituição poderia influenciar as propriedades luminosas da molécula por meio do efeito *light up* (aumento na intensidade de emissão).⁴⁷

Derivados BTDs monossustituídos fluorescentes, **BTD-APBr** e **BTDAPH** (Figura 4D), também foram testados em experimentos de imageamento celular.⁴⁵ Os novos derivados apresentaram excelentes resultados com elevada seletividade por mitocôndrias e uma ótima emissão de luz por fluorescência.

Além da aplicação como marcadores celulares, os derivados BTDs também podem ser utilizados como rastreadores para compostos com atividade biológica. Em 2014, derivados do lapachol, **BTDLap** e **BTDFen** (Figura 4G), puderam ter sua atividade rastreada no interior de células cancerígenas (MCF-7), pois foram marcados com uma etiqueta fluorescente.⁴⁸

Em 2014, uma sonda lipofílica foi sintetizada com o objetivo de se mimetizar a estrutura de um ácido graxo.⁴⁹ Obteve-se então um marcador fluorescente com o núcleo BTD e cadeia carbônica do ácido oleico, **BTD-AO** (Figura 4F). O composto mostrou-se bastante eficiente na tarefa de rastrear a dinâmica metabólica dos ácidos graxos no meio celular. Sua aplicação permitiu que investigações a respeito da internalização e dinâmica celular fossem realizadas em diferentes temperaturas (4 °C e 37 °C).

Com o objetivo de se compreender como as alterações estruturais afetam a seletividade no meio celular, uma série de compostos dissustituídos derivados da **BTD-APBr** (Figura 4E) foram sintetizados.⁵⁰ Neste estudo, observou-se que dentre as estruturas sintetizadas, o composto **BTD-APMPH** apresentou maior intensidade de luminescência devido à presença do grupo doador **PhOMe** em sua estrutura, e o composto **BTD-APTPy** foi o único que apresentou relativa seletividade no interior da célula. A partir dessas observações, concluiu-se que o **PhOMe** seria responsável pelo efeito *light up* e o substituinte **-C≡C-Py** seria responsável pela direcionalidade de marcação. Com isso, concluiu-se que a união desses dois grupos em uma única molécula poderia trazer bons resultados em termos de seletividade. O composto em questão, **Splendor**, já havia sido sintetizado, anteriormente pelo grupo.⁴⁶ Esta molécula se mostrou um excelente marcador e estudos de *docking molecular* mostraram que ela se liga à proteína de translocação ANT*.

Dois núcleos BTDs foram unidos em uma mesma molécula por meio do protocolo de aminação de Buchwald-Hartwig, levando à formação do composto **BTDNHBT**⁵¹ (Figura 4H). Esta molécula apresentou elevada estabilidade e também foi testada em experimentos de marcação celular, no entanto não apresentou seletividade para nenhuma organela no meio celular.

A união do núcleo BTD com outros núcleos fluorescentes também é uma alternativa interessante no planejamento de novos fluoróforos. Uma vez que as propriedades fotofísicas de mais de um núcleo podem ser combinados em uma única molécula, podendo levar a um composto com características superiores aos dos núcleos de partida isolados. Fazendo uso desta estratégia, em 2016, foi sintetizado o composto **BTDLIP**⁵² (Figura 4I), que foi planejado a partir da união da BTD com o núcleo cumarina. O híbrido formado apresentou excelentes resultados nos experimentos de Bioimageamento, sendo altamente seletivo para gotas lipídicas†.⁵³

Mais recentemente, uma nova linha de pesquisa passou a ser explorada pelo grupo. Em 2019, foi publicado um trabalho em que os derivados BTDs foram sintetizados

* Proteína mais abundante na membrana interna da mitocôndria, responsável pelo transporte de ATP.

† Estruturas encontradas no citoplasma contendo altas concentrações de lipídios.⁴⁹

via reações intracelulares.⁵⁴ Os substratos necessários para a síntese do composto **BTD-APH** foram adicionados separadamente dentro de uma célula, e após a adição do catalisador de paládio, foi observada a fluorescência característica desta sonda nas mitocôndrias.

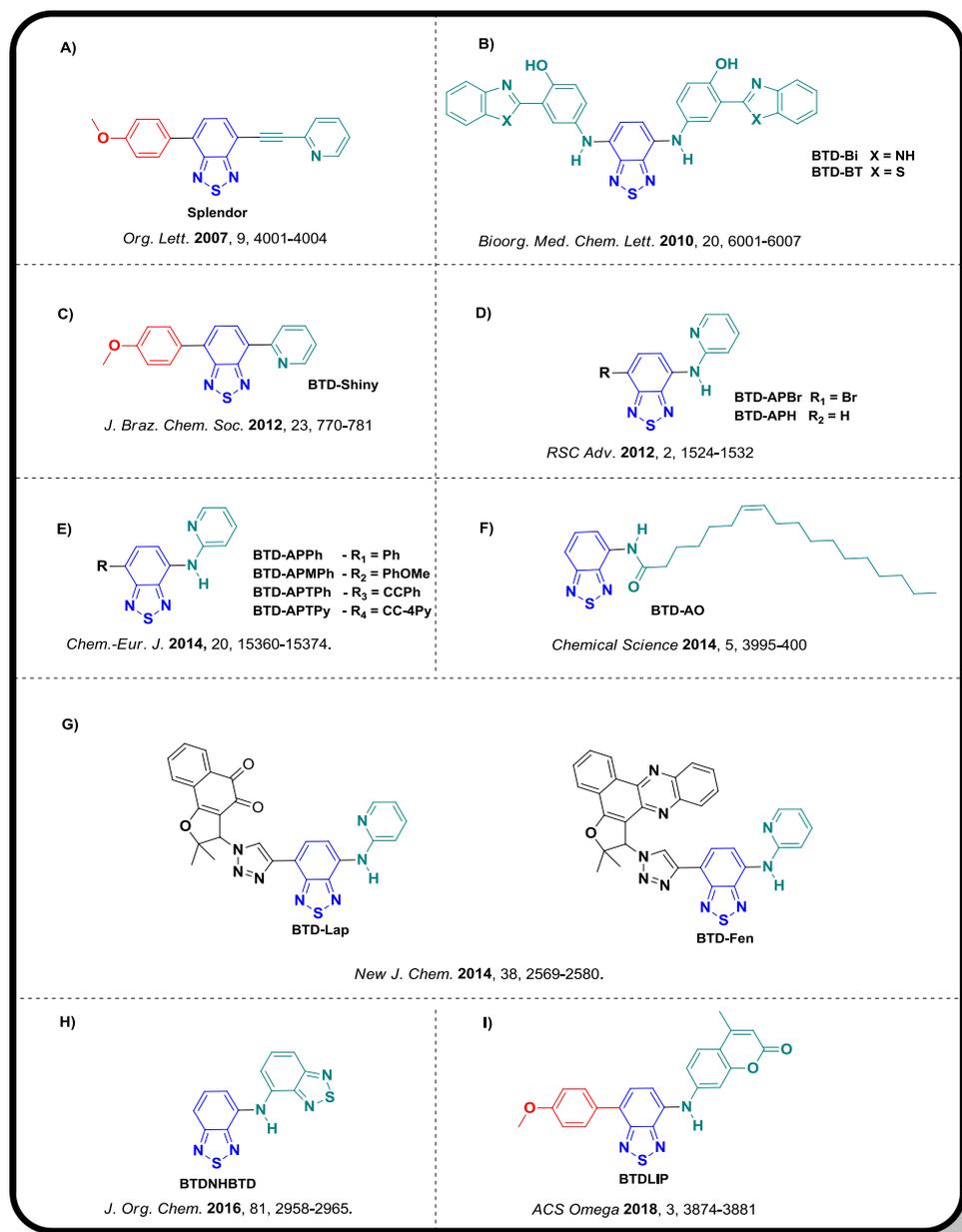


Figura 4. Estruturas dos derivados BTD sintetizados e testados em aplicações biológicas pelo grupo desde 2007.

Nos últimos anos, o uso do núcleo BTM em aplicações de Bioimageamento avançou significativamente. Além dos trabalhos realizados pelo grupo do professor Neto, pesquisadores de outros centros de pesquisa também tem contribuído para o desenvolvimento do campo. Na Figura 5 são apresentados moléculas sintetizadas por outros grupos e que também foram testadas como possíveis marcadores. Os resultados apresentados trouxeram colaborações significativas para a área. Apesar disso, muito ainda há de ser feito.

O maior desafio é compreender a relação de afinidade entre as estruturas dos fluoróforos e das organelas. Pouco ainda se sabe sobre as estratégias para direcionar e gerar seletividade no meio intracelular.¹⁴

Na Figura 5, é possível observar as estruturas de derivados BTMs sintetizados por outros grupos de pesquisa e que também foram aplicadas em experimentos de Bioimageamento e trouxeram contribuições significativas para o desenvolvimento do campo. Em 2013, foi sintetizado o composto **BTM-GL** (Figura 4A).⁵⁵ O trabalho envolveu a união do núcleo BTM com um glicoligante. Estes ligantes são conhecidos por sua capacidade de se complexar com íons metálicos. Os experimentos de marcação celular realizados pelo grupo mostraram que a molécula pode ser utilizada como marcador de membrana. Ainda no mesmo ano, foi realizado o primeiro trabalho com a formação da espécie emissora dentro da própria célula.⁵⁶ Neste trabalho, um derivado BTM não luminescente, contendo dois grupos nitro (Figura 4C), foi reduzido pela proteína nitroreductase no meio intracelular. A reação levou à formação de grupos amino na estrutura da molécula, fazendo com que a molécula se tornasse fluorescente, emitindo luz na região do vermelho. Em 2017, derivados BTM mono e dissustituídos contendo o grupo 4-aminopiridina (Figura 4B) foram testados em experimentos de Bioimageamento. Os compostos apresentaram luminescência dependente do pH, e foi observado também que o derivado monossustituído apresentou seletividade por mitocôndrias dentro da célula. Outro derivado BTM monossustituído com propriedades bastante interessantes foi apresentado no mesmo ano (Figura 4D). O composto **LD-BTM1** exibiu um perfil não tóxico com excelente sinal de luminescência no meio celular, que marca seletivamente gotas lipídicas intracelulares.⁵⁷

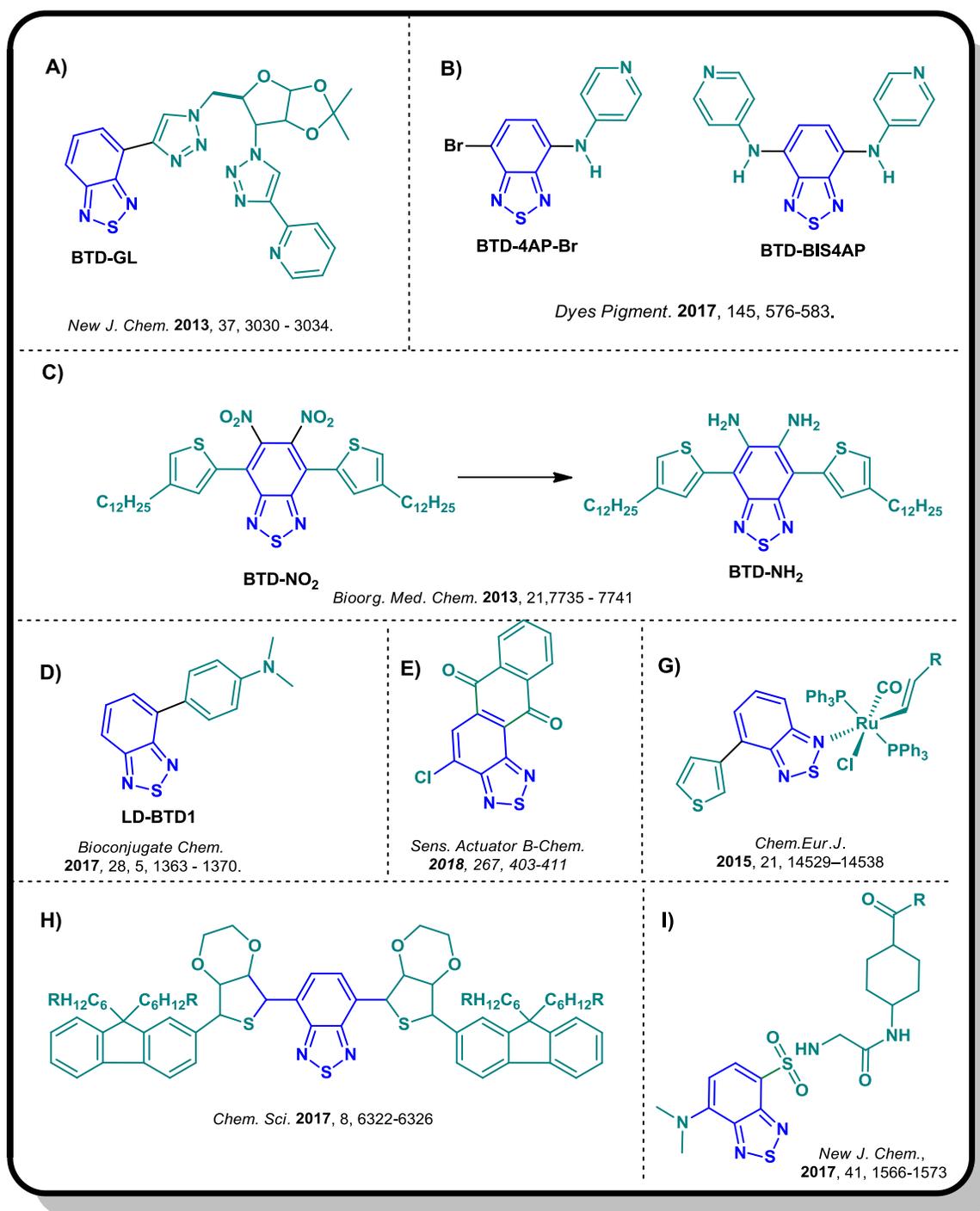


Figura 5. Derivados BTDs sintetizados por outros grupos e testados como sondas fluorescentes.

1.2 Planejamento para marcação seletiva

As interações e relações de afinidade entre as sondas fluorescentes e os seus alvos de marcação são pouco compreendidas.¹⁴ A capacidade de se prever os requisitos estruturais de um composto afim de se obter um resultado de marcação e seletividade é ainda muito limitado. Uma abordagem para o desenvolvimento de marcadores consiste primeiro na identificação dos elementos de reconhecimento dos alvos. Se o alvo de marcação é um íon metálico, a molécula de marcação deve conter em sua estrutura sítios nucleofílicos de ancoragem como pares de elétrons não ligantes disponíveis para complexação com essas espécies, por exemplo estruturas com éter de coroa.⁵⁸ Para a marcação de açúcares, o uso de ácidos borônicos é uma alternativa bastante viável.⁵⁹

Na caracterização de biomoléculas e organelas no meio intracelular, além dos desafios de se encontrar uma relação de afinidade entre a sonda fluorescente e o alvo de marcação, existem diversos outros obstáculos a serem superados afim de se obter uma estrutura final que possa ser testada.⁶⁰ As propriedades fotofísicas da molécula devem apresentar características desejáveis como alto brilho, rendimento quântico, fotoestabilidade, absorção de comprimentos de onda de menor energia. Devem ainda apresentar solubilidade no meio celular, e não serem citotóxicas.

As mitocôndrias possuem potencial de membrana negativo bastante acentuado (~ -180 mV)⁶¹ e o uso de moléculas com carga positiva se apresenta como uma boa alternativa para direcionar os marcadores. No entanto, não são as únicas estruturas com potencial negativo no meio intracelular e acreditar que esta afinidade seja gerada apenas pelo fator de atração eletrostática pode ser equivocado.

Um composto comercial amplamente utilizado para marcação de mitocôndrias é o **MitoTracker Red** (Figura 5A). Derivado do núcleo luminescente xanteno, apresenta carga positiva em sua estrutura e é bastante utilizado em experimentos de imageamento celular. Os compostos **Xant-A** e **Xant-B** também são derivados do núcleo xanteno, no entanto, devido a pequenas alterações em suas estruturas, eles apresentam seletividades diferentes no meio celular.⁶² O composto **Xant-A** apresenta maior afinidade

para lisossomos, enquanto o composto **Xant-B**, carregado positivamente, tem uma afinidade maior por mitocôndrias.

Um exemplo de estratégia para gerar seletividade dentro da célula é adicionar o grupo funcional trifenilfosfônio (TFF) à estrutura dos marcadores.⁶³⁻⁶⁵ Por exemplo, ao se comparar as estruturas dos compostos Brometo de etídio (marcador comercial de DNA) e MitoSOX (marcador comercial para mitocôndrias) (Figura 6B), pode-se observar que o núcleo fluorescente de ambas as moléculas é o mesmo, e a principal diferença estrutural é a presença do grupo TFF.⁶⁶

Os derivados do núcleo BTD, **BTD-AO** e **BTDH** (Figura 5C), apresentam comportamentos bastante diferente no meio celular. Pode-se verificar que o composto **BTD-AO** possui em sua estrutura uma longa cadeia carbônica, por esta razão, este composto apresenta grande afinidade por lipídios.⁴⁹ O derivado **BTDH**, com o grupo 2-aminopiridina, é seletivo para mitocôndrias.⁶⁷ Isto mostra que compostos neutros também podem apresentar afinidade pela organela mitocôndria.

Estes exemplos mostram como moléculas pequenas podem apresentar comportamento completamente diferente em experimentos de imageamento celular, apenas com pequenas modificações em suas estruturas. Mostram também como o conhecimento para a elaboração de estratégias de seletividade ainda é vago e pouco consolidado e que há muitas variáveis e questões a serem resolvidas neste campo de estudo.

Com o objetivo de desenvolver mais a área de aplicação das BTDs nos experimentos de Bioimageamento e gerar uma estratégia de direcionalidade no meio celular, apresentamos neste trabalho uma série de derivados do núcleo BTD. Os compostos apresentam variações estruturais planejadas com o propósito de se determinar de maneira mais clara o efeito que essas mudanças induzem na relação de afinidade entre as sondas fluorescentes e as organelas.

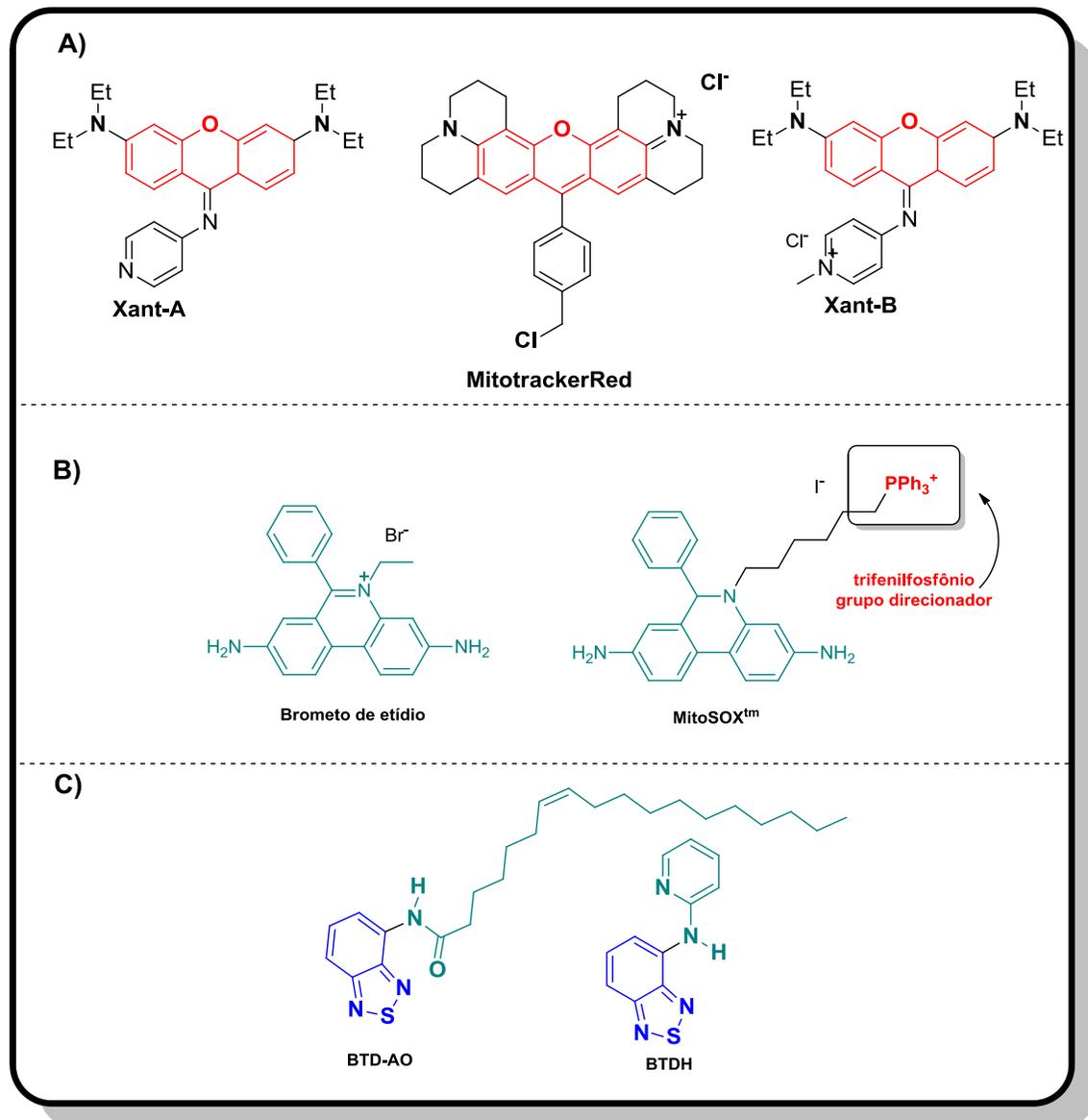


Figura 6. Marcadores comerciais brometo de etídio (seletivo para dsDNA) e MitoSOX (seletivo para mitocôndrias).

2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo a síntese e caracterização de novas moléculas fluorescentes com conjugação π -estendida derivadas do núcleo BTB com potencial para aplicação biológica em experimentos de imageamento celular.

3 Resultados e discussões

Neste trabalho foi escolhido um derivado BTD que pudesse ser facilmente funcionalizado para se avaliar o efeito que isto traria na questão da seletividade dentro do meio celular.

Utilizamos o derivado BTD monossustituído com o grupo 4-aminopiridina (Figura 7). Esta molécula apresenta um grupo piridínico em sua estrutura, em posição *para* em relação ao grupo amino. A presença e posição deste grupo permitem que o composto seja funcionalizado de maneira simples, via reações de substituição nucleofílica com os substratos adequados. Outros fatores para a escolha desta estrutura são os resultados apresentados em um trabalho do grupo em 2012,⁶⁷ utilizando derivados BTD monossustituído com 2-aminopiridina (Figura 4D, **BTD-APBr** e **BTD-APH**) em que as moléculas sintetizadas apresentaram afinidade por mitocôndrias. Com isso, buscávamos compreender o efeito que a posição do átomo de nitrogênio na porção piridínica da molécula teria na seletividade. O segundo fator foi o trabalho de Hou e colaboradores,⁶⁸ que também utilizaram o grupo 4-aminopiridina em derivados mono e dissustituídos (Figura 4B, **BTD-4AP-Br** e **BTD-BIS4AP**). Assim como **BTD-APBr** e **BTD-APH**, a estrutura **BTD-4AP-Br** (Figura 3D), apresentou preferência por mitocôndrias.

Com base nestes resultados, acreditava-se que o composto **BTD-4AP** também apresentaria afinidade por mitocôndrias e que as futuras alterações em sua estrutura modificariam o seu comportamento e seletividade no meio intracelular. No entanto, os resultados obtidos foram diferentes do esperado. As modificações estruturais não causaram os efeitos esperados no comportamento e seletividade das sondas. As discussões e os resultados obtidos são apresentados nas próximas sessões deste texto.

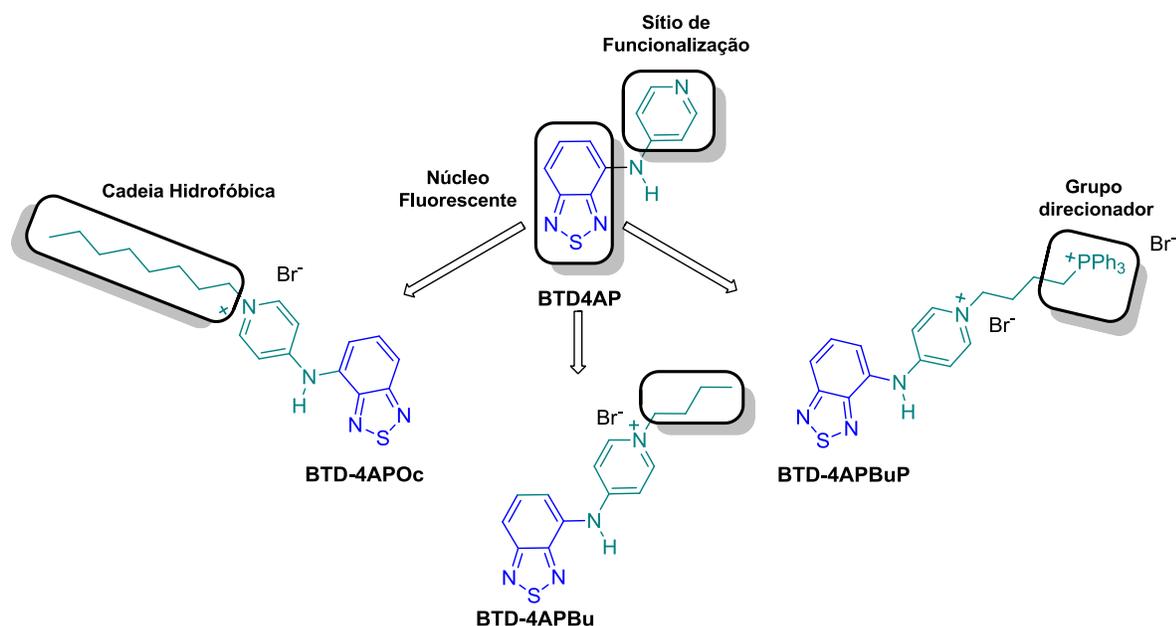
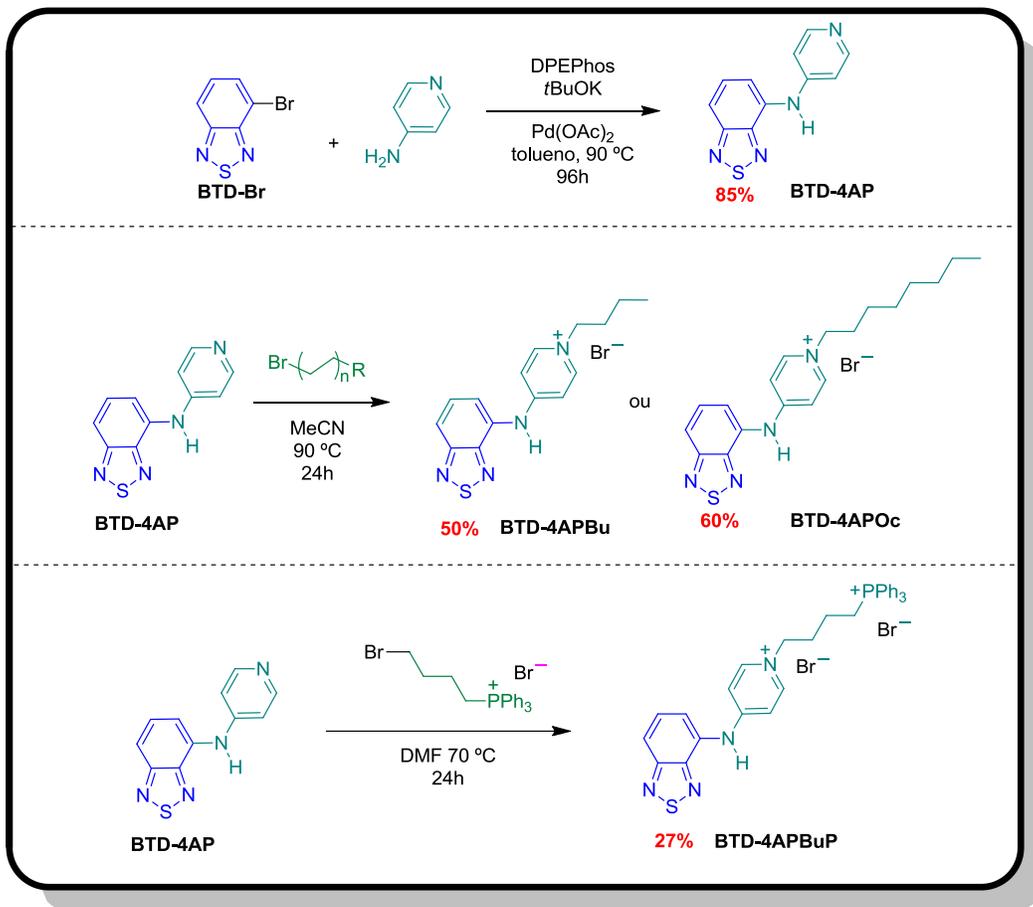


Figura 7. Derivados BTDs sintetizados e testados como possíveis marcadores neste trabalho.

3.1 Síntese

As rotas sintéticas utilizadas para obtenção dos derivados utilizados neste trabalho são apresentadas no Esquema 2. Para a síntese do **BTD-4AP**, foi utilizado o protocolo de aminação de Buchwald-Hartwig,⁶⁹ o produto foi obtido com 85% de rendimento. O composto **BTD-4AP** foi utilizado como material de partida para as demais reações de funcionalização. Primeiro foram obtidos os derivados monocarregados com grupos lipofílicos. **BTD-4AP** alquilado com 1-bromobutano e em seguida com 8-bromooctano, levando à formação dos compostos **BTD-4APBu** (50%) e **BTD-4APOC** (60%), respectivamente. O composto bicarregado, **BTD-4APBuP**, com o grupo TFF em sua estrutura, foi obtido com 27% de rendimento via alquilação com o intermediário BrButPhos sintetizado previamente.



Esquema 2. Síntese dos derivados BTDs.

3.2 Propriedades Fotofísicas

Os quatro derivados BTDs fluorescentes tiveram suas propriedades fotofísicas investigadas por meio de análises de espectrofotometria e espectrofluorimetria em diferentes solventes para se verificar os efeitos solvatocrômicos. Os dados obtidos podem ser vistos na Tabela 1. Todos os compostos apresentaram grande deslocamento de Stokes, indicando a estabilidade no estado excitado.⁷⁰ Os gráficos dos efeitos solvatocrômicos (ETN vs cm⁻¹),⁷¹ representados na Figura 8, apresentam elevados valores de R². Este dado indica a ocorrência de um eficiente processo ICT (*intra charge transfer*) na estabilização do estado excitado.⁷²

Tabela 1. Dados fotofísicos para os compostos BTDs em diferentes solventes (todas as soluções foram medidas com concentração de 10 μ M).

Composto	Solvente	$\lambda_{max}(abs)$ (nm)	Log ϵ	$\lambda_{max}(em)$ (nm)	Δ de Stokes (nm)
BTD-4AP	CH ₂ Cl ₂	404	3.9	543	139
	DMSO	417	3.9	570	153
	MeCN	403	4.0	551	148
	MeOH	402	3.8	572	170
	Tolueno	404	3.9	533	129
	Água	362	3.9	552	190
BTD-4APOc	CH ₂ Cl ₂	367	3.4	525	158
	DMSO	374	3.5	529	155
	MeCN	363	3.3	517	154
	MeOH	364	3.3	520	156
	Tolueno	379	3.4	509	130
	Água	366	3.3	552	186
BTD-4APBu	CH ₂ Cl ₂	365	3.3	535	170
	DMSO	375	3.2	526	151
	MeCN	363	3.3	540	177
	MeOH	365	3.3	521	156
	Tolueno	385	2.8	528	143
	Água	365	3.2	550	185
BTD-4APBuP	CH ₂ Cl ₂	371	3.2	504	133
	DMSO	372	2.8	527	155
	MeCN	369	3.1	512	143
	MeOH	362	3.2	519	157
	Tolueno	377	2.3	527	150
	Água	367	3.2	538	171

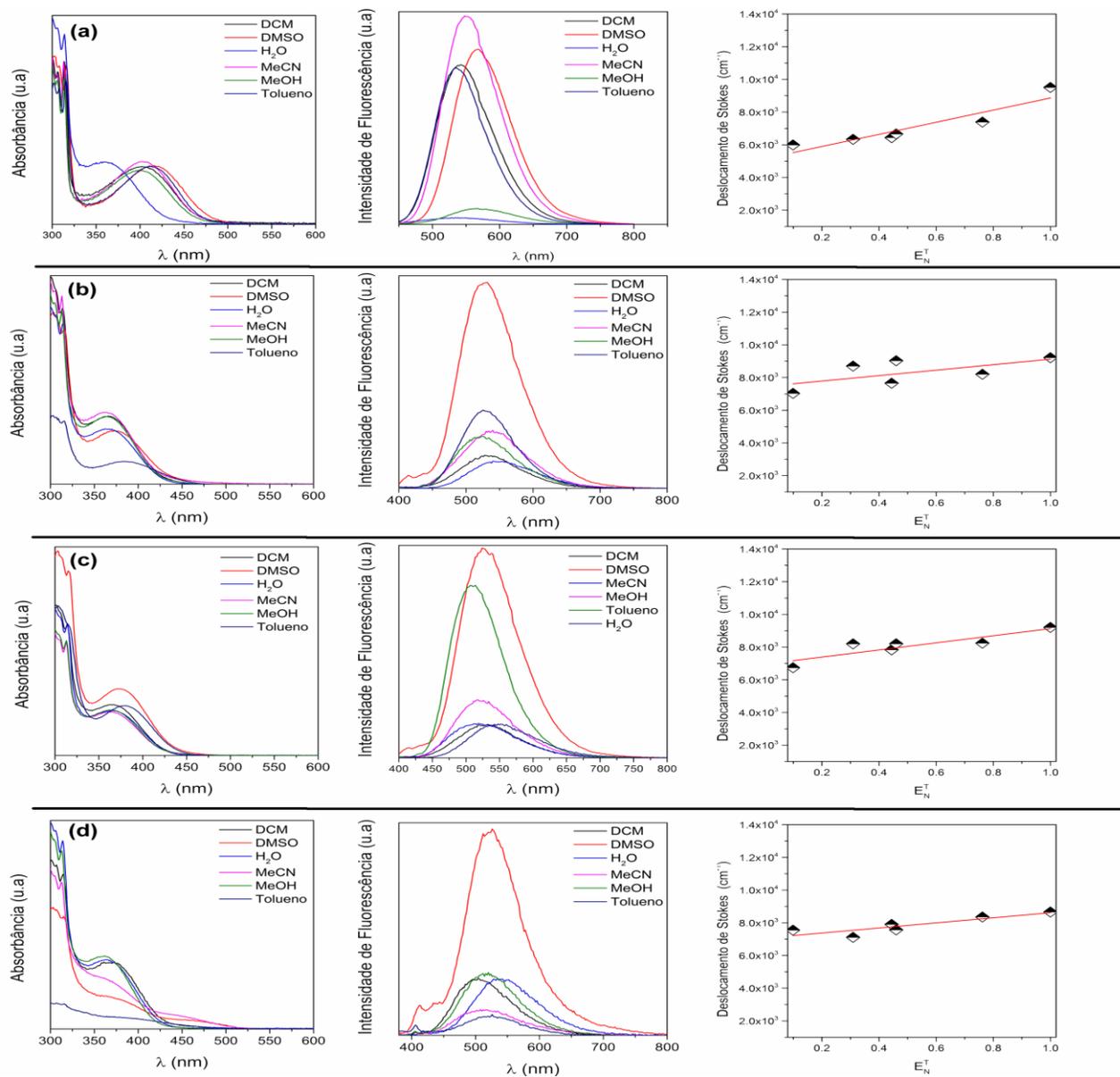


Figura 8. Espectros de UV-Vis, fluorescência e efeitos solvatocrômicos das BTDs. (a) **BTD-4AP**, (b) **BTD-4APOc**, (c) **BTD-4APBu**, (d) **BTD-4APBuP**. Todas as análises foram realizadas em solução a 10 μ M.

As absorções de menor energia observadas nos espectros de UV-Vis (Figura 7), responsáveis pela excitação eletrônica $S_0 \rightarrow S_1$, são do tipo **HOMO-LUMO** (**HOMO** - *Highest Occupied Molecular Orbital* - **LUMO** - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) decorrentes de transições $\pi-\pi^*$. Nos compostos sintetizados, o orbital LUMO está localizado majoritariamente no anel tiadiazola do núcleo BTD.^{73,74} O orbital HOMO se encontra distribuído por toda a estrutura do composto,^{67,73} tanto no anel piridina quanto no núcleo BTD. A adição dos grupos alquilas no nitrogênio piridínico não altera de maneira significativa essa distribuição, uma vez que carbonos sp^3 só poderiam transferir elétrons para porção aromática por efeito indutivo, por meio das ligações σ .

Analisando-se os dados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que o composto **BTD-4AP** apresenta os maiores valores de absorvidade molar (ϵ) e também absorção em comprimentos de onda de menor energia (Abs > 400 nm, com exceção da água) quando comparado com os demais derivados catiônicos. Isso ocorre, porque após a funcionalização com os grupos alquilas, há uma perturbação da nuvem eletrônica da molécula. Após a alquilação, os pares de elétrons não ligantes do nitrogênio piridínico não estão mais disponíveis, isso faz com que ocorra uma diminuição da energia dos orbitais HOMO do novo composto formado. Esta diminuição no nível da energia faz com que comprimentos de onda mais energéticos sejam absorvidos.

Quando dissolvido em solventes próticos, há a formação de ligações de hidrogênio com as moléculas do solvente. Essas interações causam distorções no plano da molécula, fazendo com que o anel piridínico e benzotiadiazola saiam do mesmo plano, contribuindo também para uma diminuição no nível de energia do orbital HOMO (Figura 8a) e diminuição da intensidade de emissão em solventes polares (Figura 8b).

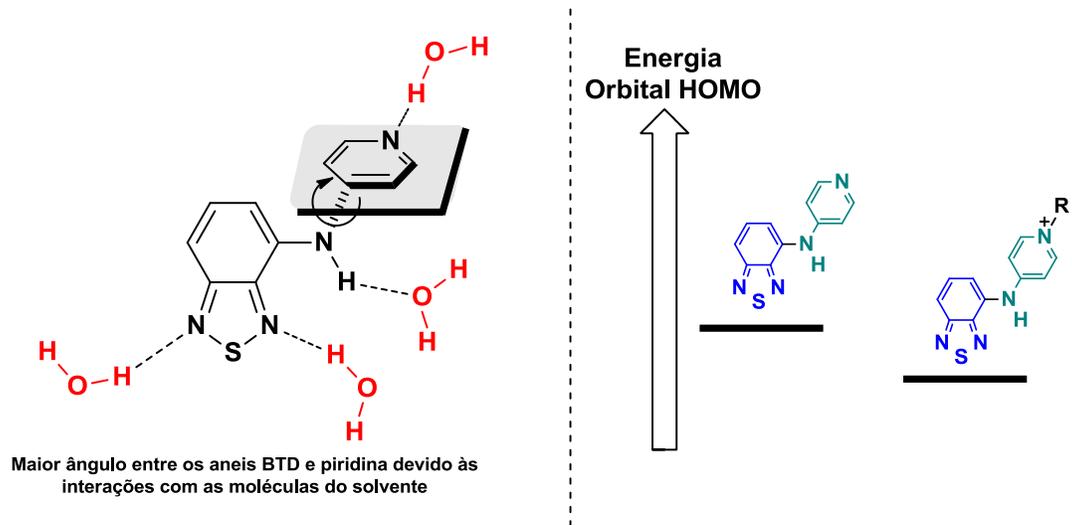


Figura 9. Modelo de interação proposto entre as moléculas de água e o composto **BTD-4AP**.

3.3 Cálculos Teóricos

Para melhor compreender as propriedades fotofísicas dos derivados sintetizados, cálculos teóricos foram realizados com a otimização das geometrias das estruturas (Figura 10).

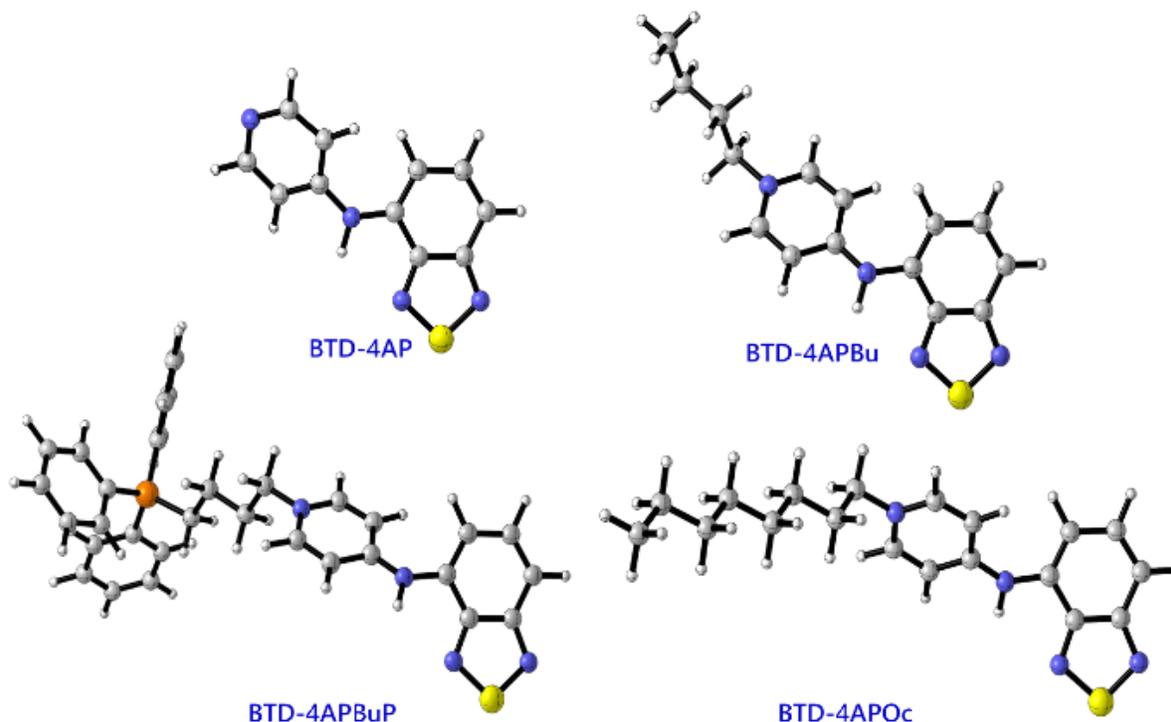


Figura 10. Geometrias otimizadas das estruturas **BTDA-4AP** (neutra), **BTDA-4APBu** (catiônica), **BTDA-4APBuP** (dicatiônica) e **BTDA-4APoc** (catiônica), no vácuo obtidas por meio de cálculos com nível CAM-B3LYP/6-31G(d).

Os máximos de absorção dos derivados BTDA foram calculados por meio de métodos TD-DFT (*time dependence density functional theory*) que já são bastante utilizados para reprodução de espectros de absorção de fluoróforos orgânicos. Foram utilizados diferentes funcionais de correlação e troca (XC) com a função de base 6-311G+(2d,p). Os cálculos obtidos com os funcionais B3LYP, CAM-B3LYP, LC- ω PBE, M06, M062X, e PBE1PBE foram avaliadas com o objetivo de se determinar qual método fornece resultados de absorbância próximos aos resultados obtidos experimentalmente.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados dos cálculos dos máximos de absorção dos derivados BTDs. Como esperado para estes compostos,⁷⁵⁻⁷⁹ as transições encontradas são do tipo $\pi-\pi^*$.

Tabela 2. Dados experimentais e teóricos dos comprimentos de onda de absorção dos compostos **BTD-4AP**, **BTD-4APBu**, **BTD-4APBuP** e **BTD-4APOc** obtidas com cálculos TD-DFT utilizando nível de teoria 6-311+G(2d,p).

		Exp.	B3LYP	CAM-B3LYP	LC- ω PBE	M06	M06-2X	PBE1PBE
BTD-4AP	Solvente				λ_{max}			
	CH ₂ Cl ₂	404	448.58	382.95	345.10	428.63	375.66	429.48
	DMSO	417	448.63	383.02	345.10	428.45	375.48	429.46
	MeCN	403	447.90	382.32	344.41	427.75	374.81	428.75
	MeOH	402	447.74	382.16	344.25	427.59	374.66	428.59
	Tolueno	404	448.84	383.22	345.51	429.58	376.52	429.93
	Água	363	447.82	382.24	344.31	427.61	374.68	428.65
BTD-4APOc	Solvente				λ_{max}			
	CH ₂ Cl ₂	367	388.96	342.82	315.24	377.28	338.09	375.05
	DMSO	374	394.12	345.49	316.84	380.93	340.37	379.49
	MeCN	363	393.10	344.67	316.11	380.00	339.56	378.53
	MeOH	364	392.80	344.45	315.92	379.74	339.35	378.26
	Tolueno	379	378.95	337.68	312.31	370.87	334.09	366.45
	Água	366	393.99	345.09	316.33	380.61	339.91	379.29
BTD-4APBu	Solvente				λ_{max}			
	CH ₂ Cl ₂	365	388.57	342.59	315.06	377.02	337.90	374.71
	DMSO	375	393.74	345.25	316.66	380.66	340.17	379.15
	MeCN	363	392.72	344.43	315.93	379.73	339.36	378.19
	MeOH	365	392.41	344.21	315.74	379.46	339.15	377.91
	Tolueno	385	378.53	337.45	312.14	370.57	333.89	366.06
	Água	365	393.61	344.85	316.14	380.34	339.71	378.95
BTD-4APBuP	Solvente				λ_{max}			
	CH ₂ Cl ₂	371	383.42	339.10	312.43	372.70	334.63	369.65
	DMSO	372	390.07	342.38	314.35	377.28	337.45	375.65
	MeCN	369	388.93	341.52	313.60	376.28	336.61	374.60
	MeOH	362	388.58	341.28	313.40	375.99	336.38	374.28
	Tolueno	377	374.07	334.01	309.60	367.61	331.15	361.78
	Água	367	388.02	340.92	313.79	376.45	336.51	374.83

Os espectros teóricos de absorção (Figura 11) dos derivados BTDs foram calculados com nível de cálculo PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31G(d). O funcional CAM-B3LYP possui grande precisão em estudos de excitação com transferência de cargas e por isto sua utilização. Os espectros teóricos apresentaram o mesmo comportamento dos espectros experimentais e os seguintes pontos devem ser destacados: (i) as bandas dos λ mais longos são menos intensas do que as bandas do λ mais curtos; (ii) o modelo de solvatação PCM (*Polarizable Continuum Model*) não apresentou deslocamentos solvatocrômicos, fato este também observado nos dados experimentais (Figura 7 e Tabela 1) em que a natureza do solvente não alterou a posição das bandas, com exceção da **BTD-4AP** em água e da **BTD-4APBu** em tolueno; (iii) os espectros dos compostos catiônicos simulados em tolueno apresentaram um comportamento errático, com as duas bandas de absorção apresentando as mesmas intensidades. No entanto, este fato também foi observado no espectro experimental em tolueno para o composto **BTD-4APBuP**.

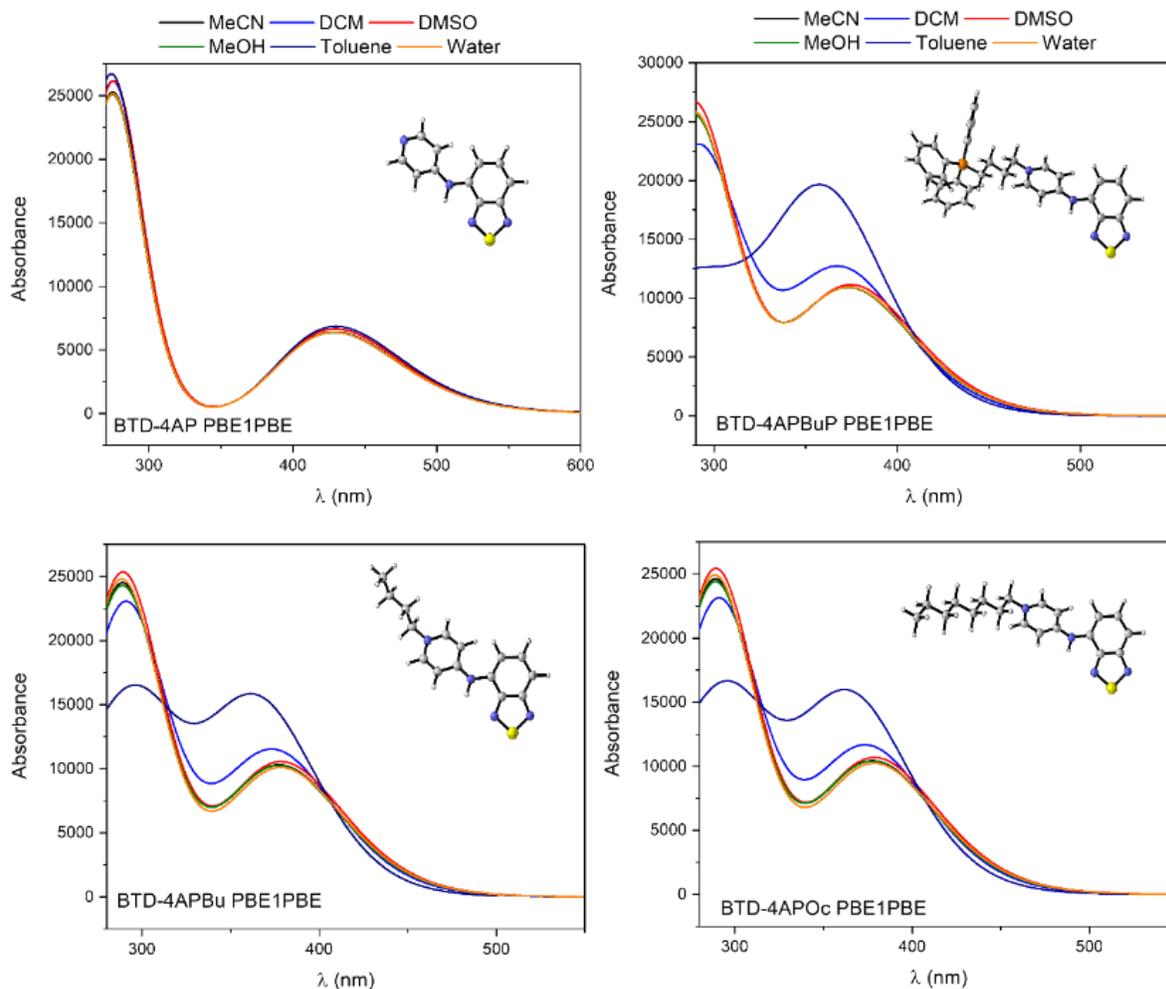


Figura 11. Espectros de absorção simulados dos derivados BTDs em diferentes solventes calculados com níveis de teoria PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31G(d).

Os orbitais moleculares envolvidos nas transições eletrônicas $S_0 \rightarrow S_1$ são apresentados na **Figura 12**. Estas transições HOMO-LUMO são do tipo $\pi-\pi^*$, com o orbital LUMO centrado essencialmente no núcleo BTD, devido ao seu forte caráter acceptor de elétrons. Como demonstrado na Figura 12, os orbitais HOMO não se espalham além da porção aromática das moléculas. E comparando-se os compostos **BTD-4APBu** e **BTD-4APOc**, percebe-se que o tamanho da cadeia alquílica não afeta as transições $\pi-\pi^*$. A posição das bandas de absorção destas moléculas não muda, uma vez que carbonos sp^3 adicionais não afetam o sistema π da molécula.

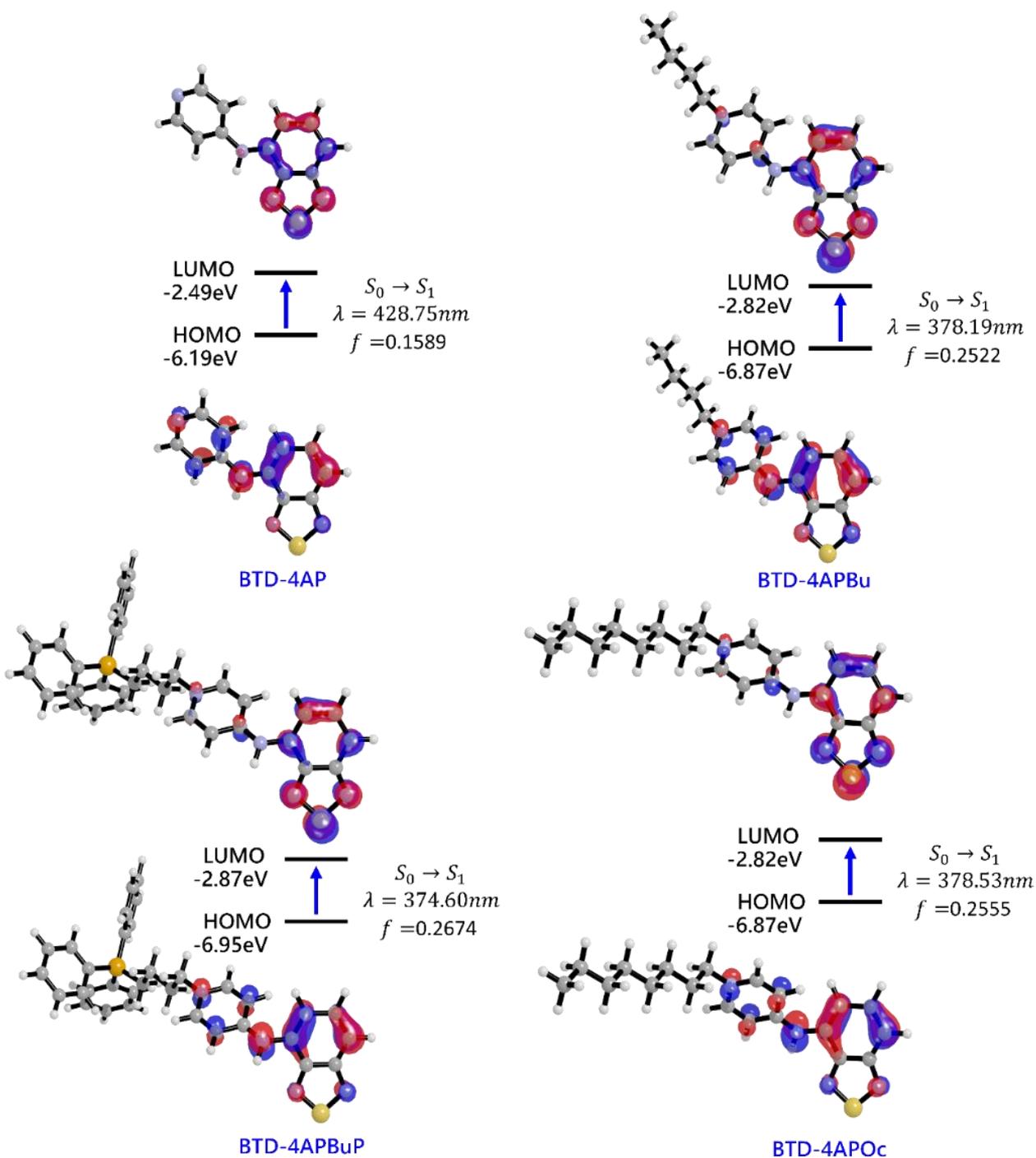


Figura 12. Orbitais dos derivados **BTD-4AP**, **BTD-4APBu**, **BTD-4APBuP** e **BTD-4APOc** em acetonitrila, envolvidos nas transições $S_0 \rightarrow S_1$ calculados com PBE1PBE/6-311+G(2d,p)//CAM-B3LYP/6-31G(d).

3.4 Experimentos Biológicos

3.4.1 Ensaio de viabilidade celular

Antes dos compostos serem testados como marcadores fluorescentes, experimentos de citotoxicidade foram realizados (Figura 13) para avaliar o efeito que estas moléculas teriam na viabilidade das células. Em baixas concentrações, a 10 μM , nenhum efeito foi notado. No entanto, em concentrações maiores, a 100 μM , todas as moléculas causaram efeitos de citotoxicidade nas células testadas. Os resultados mostram que os compostos podem ser utilizados como marcadores fluorescentes, uma vez que os experimentos de Bioimageamento são conduzidos em concentrações de 1 μM .

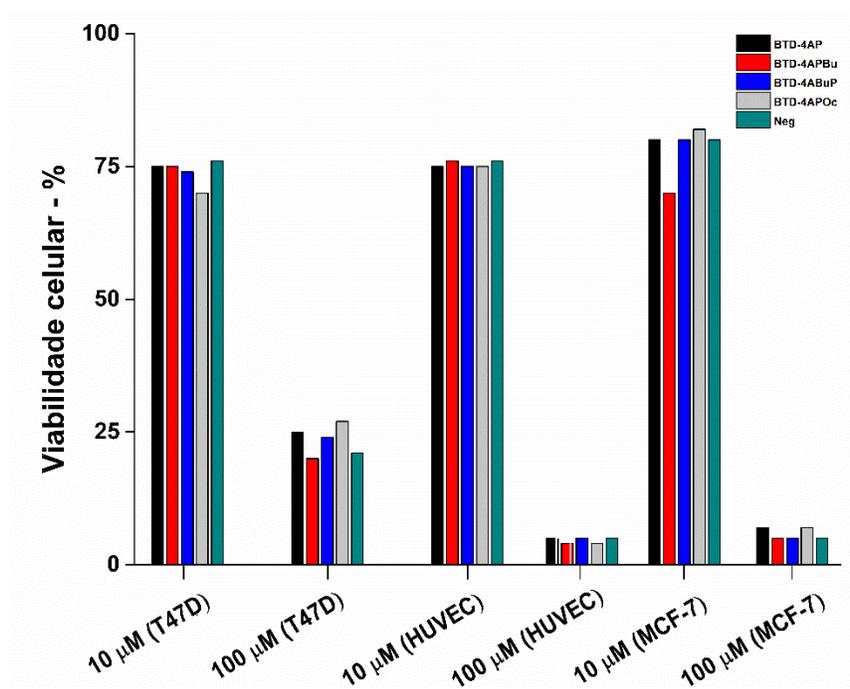
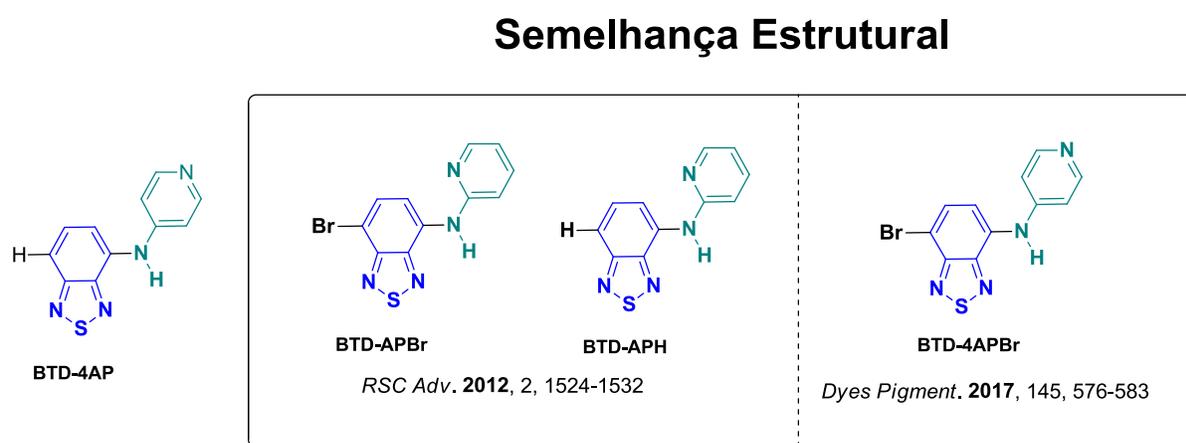


Figura 13. Viabilidade celular determinada por análises de MTT. O gráfico mostra que nenhum efeito citotóxico significativo é observado em concentrações de 10 μM após 24 horas. Em concentrações de 100 μM , no entanto, todos os compostos são citotóxicos. Valores de P: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4.2 Experimentos de Bioimageamento

Depois de se medir os efeitos das toxicidades nas células, os derivados BTDs foram inseridos em células tumorais. A linhagem testada inicialmente foi a MCF-7. **BTD-4AP** foi a primeira molécula a ser testada. De acordo com as conclusões apresentadas na seção anterior, acreditava-se que esta molécula apresentaria preferência de marcação para mitocôndrias, pois apresenta elevado grau de semelhança estrutural com os compostos **BTD-APBr**, **BTD-APH** e **BTD-4APBr** (Figura 14) que apresentam marcação específica para essa organela.



Seletivos para mitocôndrias

Figura 14. Semelhança estrutural das moléculas **BTD-APBr**, **BTD-APH** e **BTD-4APBr** com o composto **BTD-4AP**.

No entanto, este composto não apresentou nenhuma seletividade e se encontrou disperso pelo citossol (Figura S14, sessão experimental). Ao se avaliar o comportamento em outras linhagens celulares (células de carcinoma de ovário humano, células de câncer de mama e células de veias do endotélio umbilical) o mesmo comportamento foi observado.

O segundo composto a ser testado, **BTD-4APBu**, apresentou uma preferência por mitocôndrias tanto em células vivas quanto em fixadas (Figura S15). Contudo, o marcador também foi encontrado disperso pelo citossol, isto é, não se ligava

exclusivamente à organela. Apesar da pouca seletividade, a maior afinidade pelas mitocôndrias pode ser justificada pelo seu caráter catiônico, que faz com que seja atraído pelo potencial negativo das mitocôndrias, e sua maior lipofilicidade, devido à presença do grupo *n*-butil.⁸⁰

Com base nos resultados obtidos com o composto **BTD-4APBu**, duas possibilidades se mostraram promissoras para gerar um sensor com maior direcionalidade no meio celular (Figura 15). A primeira consiste na adição do grupo direcionador TFF na estrutura da sonda. De acordo com a literatura, a presença deste grupo induz a marcação de mitocôndrias⁶⁶ (Figura 6b). Com base neste planejamento, foi então sintetizado o composto **BTD-4APBuP**. A segunda estratégia envolve aumentar a lipofilicidade da sonda utilizando uma cadeia carbônica maior, isto foi realizado por meio de uma reação de alquilação utilizando o grupo *n*-octil, levando à formação do composto **BTD-4APOc**.

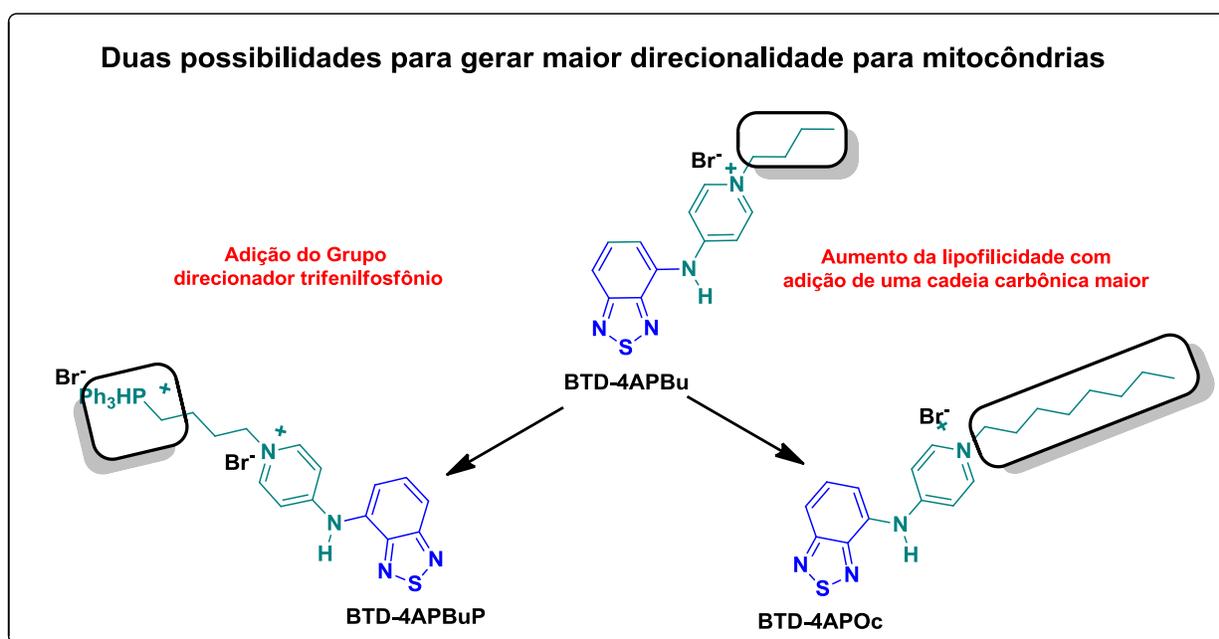


Figura 15. Representação esquemática do planejamento das arquiteturas moleculares para gerar maior direcionalidade a partir do composto **BTD-4APBu**.

O composto **BTD-4APOc** foi então testado, este se mostrou um eficiente marcador para mitocôndrias, tanto em células vivas quanto em fixadas, com um sinal luminoso verde e intenso (Figura 16).

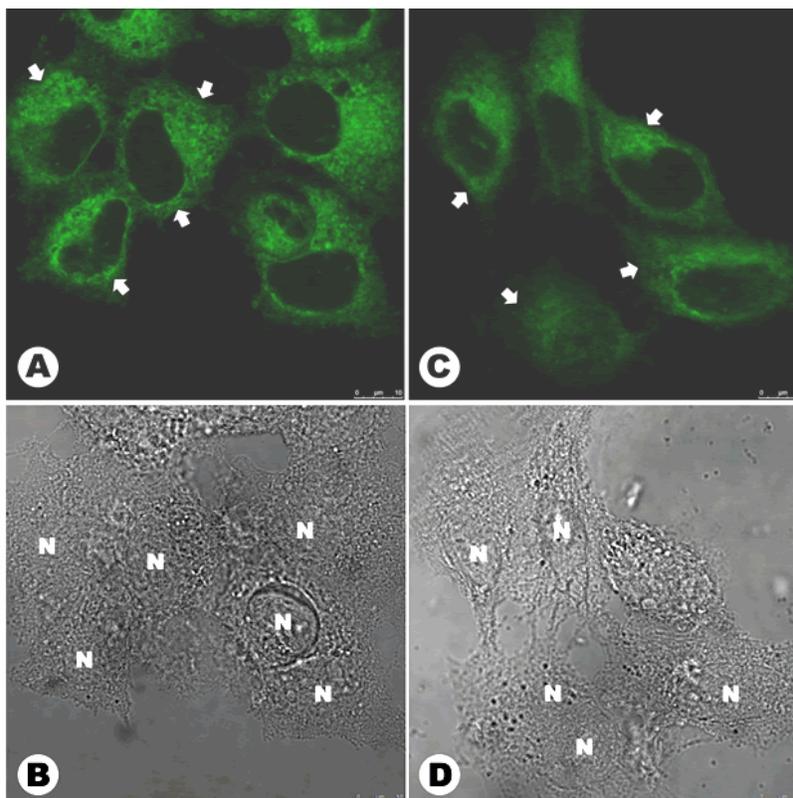


Figura 16. Perfil de fluorescência de células MCF-7 incubadas com **BTD-4APOc** (1 μ M) (A) e (C) células vivas, (B) e (D) células fixadas. (A) e (C) apresentam a distribuição de marcação no citoplasma com acumulação nas regiões próximas aos núcleos, indicadas pelas setas brancas (mitocôndrias). Os núcleos nessas imagens são indicados pela letra N. (B) e (D) apresentam as mesmas imagens, no entanto sem excitação dos corantes. Barra de escala é de 10 μ m.

Para se confirmar a seletividade do **BTD-4APOc**, experimentos de co-marcação foram conduzidos utilizando o marcador comercial MitoTracker Red. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 17. As células vivas foram marcadas seletivamente

com os dois compostos, e é possível observar a sobreposição dos sinais luminosos verdes e vermelhos na Figura 17B.

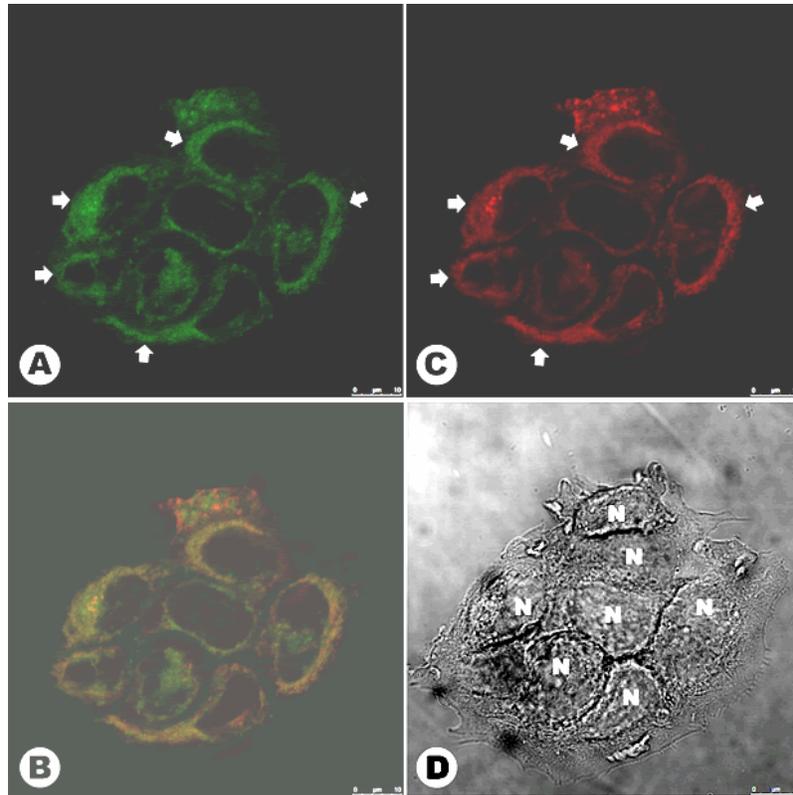


Figura 17. Experimentos de co-marcação utilizando MitoTracker Red (emissão no vermelho) e **BTD-4APOc** (emissão no verde) em células MCF-7. (A) Mitocôndria marcada com **BTD-4APOc**. (B) Sobreposição de (A) e (C) com emissão no laranja, como resultado da sobreposição do verde e vermelho. (C) Mitocôndrias marcadas com MitoTracker Red. (D) Morfologia normal das células sem excitação de fluorescência.

O experimento de co-marcação não pode ser realizado nas células fixadas (Figura 18), porque a seletividade e fluorescência do composto comercial MitoTracker Red é dependente do potencial de membrana das mitocôndrias. Assim, quando o experimento é realizado, o fluoróforo não se encontra na organela e seu sinal luminoso não pode ser observado. No entanto, é possível observar claramente a emissão do sinal do composto **BTD-4APOc**. Este resultado mostra que o mecanismo de seletividade deste marcador não é dependente do potencial de membrana da organela, apresentando assim uma grande vantagem em relação ao marcador comercial usado em conjunto.

Os experimentos de co-marcação são um método qualitativo para a confirmação da sobreposição dos sinais luminosos. O coeficiente de correlação de Person[‡] (PCC – *Pearson's Correlation Coefficient*)⁸¹ estabelece um método quantitativo entre os dois sinais. Os dados foram obtidos a partir de dez imagens, e os resultados (Figura S16) corroboram com as conclusões dos experimentos de co-marcação.

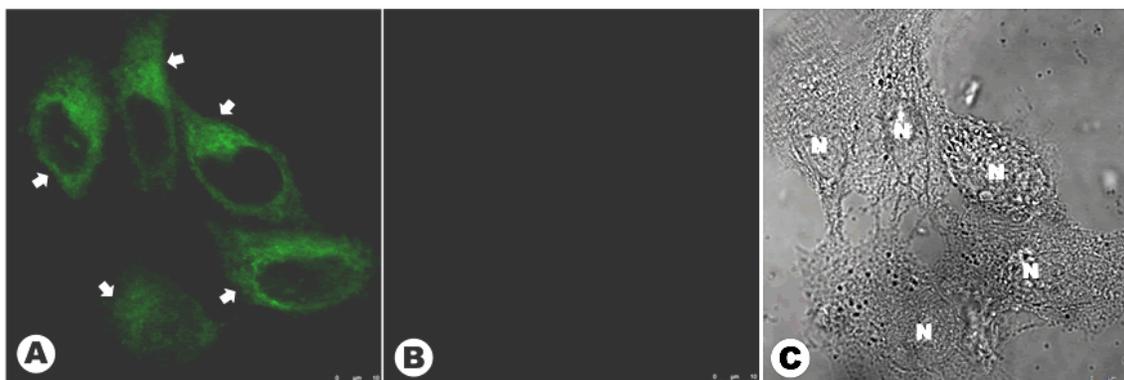


Figura 18. Experimentos de co-marcação utilizando MitoTracker Red (emissão no vermelho) e **BTD-4APOc** (emissão no verde) em células fixadas MCF-7. (A) Mitocôndria marcada com **BTD-4APOc**. (B) Células fixadas com MitoTracker Red. Nenhuma fluorescência é observada. (C) Apresenta a morfologia normal das células no microscópio, sem nenhuma excitação. A letra N indica os núcleos da célula. A barra de escala é de 10 μ M.

[‡] Mede o grau de correlação entre duas variáveis.

No composto **BTD-4APBuP**, o grupo TFF foi adicionado com a intenção de se criar um marcador altamente seletivo para mitocôndrias.^{80,82-84} A estrutura deste marcador foi inspirada na sonda comercial **MitoSox**, apresentada na Figura 6. Contudo, assim como os resultados obtidos para **BTD-4AP**, o comportamento do **BTD-4APBuP** no meio celular foi bastante diferente do esperado.

Devido ao grupo TFF presente na estrutura da molécula, acreditava-se que esta se apresentaria como um excelente marcador para mitocôndrias, no entanto, ao se realizar os experimentos, foi observado que o marcador encontrava-se majoritariamente no plasma da membrana plasmática e um pouco disperso pelo citosol. Apesar de inesperado, o resultado obtido é bastante interessante, uma vez que o desenvolvimento de marcadores para essa estrutura é também um enorme desafio^{85,86} e ainda existem poucas estruturas conhecidas que possuem essa propriedade.⁸⁷⁻⁸⁹ Na Figura 19, pode-se observar claramente a membrana plasmática marcada em verde com o composto **BTD-4APBuP**, durante o processo de divisão celular em células tumorais.

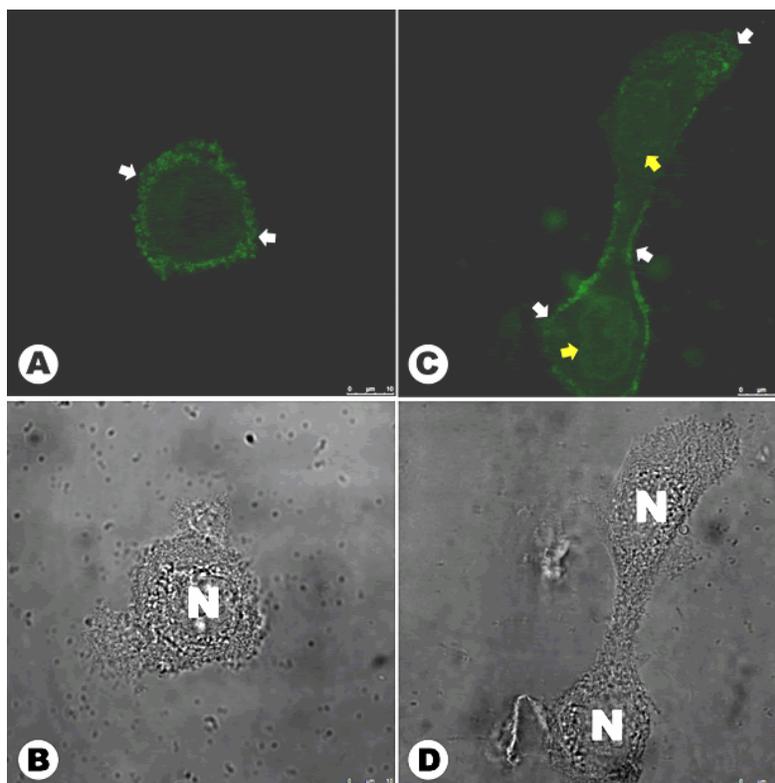


Figura 19. Perfil de fluorescência das células MCF-F incubadas com o composto **BTD-4APBuP** ($1 \mu\text{M}$) em células vivas (A) e (C) e fixadas (B) e (D). (A) e (C) apresentam a distribuição de marcação do **BTD-4APBuP** na membrana plasmática. Os indicados pelas letras (B) e (D) apresentam imagens da morfologia normal das células sem excitação de fluorescência. A letra N indica os núcleos da célula. A barra de escala é de $10 \mu\text{M}$.

Para se confirmar os resultados, experimentos de co-marcação utilizando o marcador comercial **CellMask** também foram realizados. As imagens obtidas são apresentadas na Figura 20.

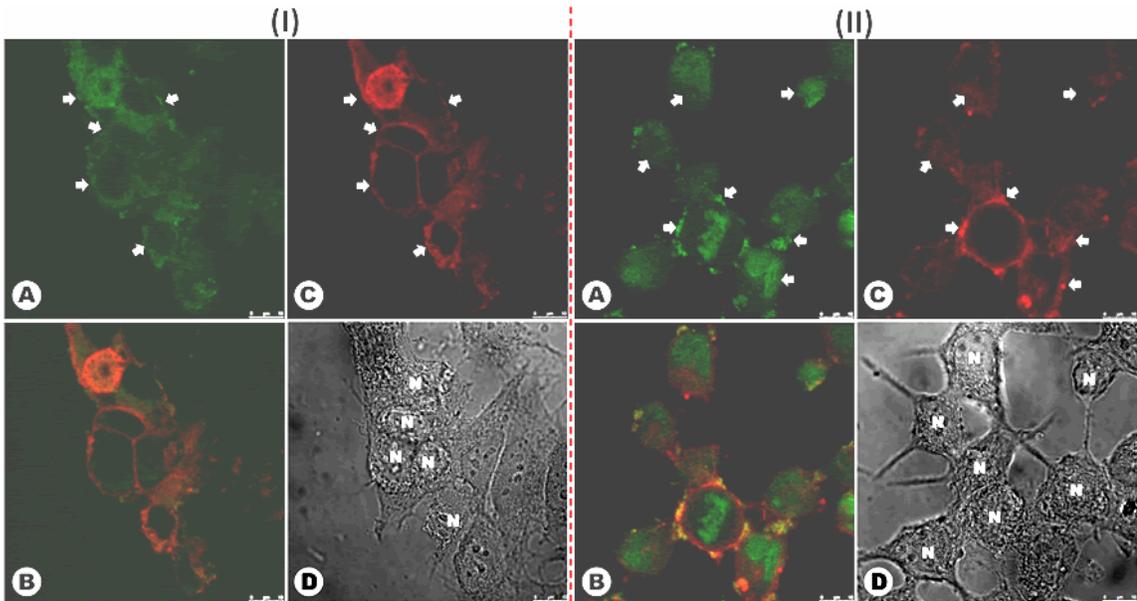


Figura 20. Experimentos de co-marcação utilizando o marcador comercial **CellMask** (emissão em vermelho) e **BTD-4APBuP** (emissão em verde) em (i) células vivas MCF-7 e (ii) células fixadas. (A) Membrana plasmática marcada com **BTD-4APBuP**. (B) Sobreposição de (A) e (C) mostrando a emissão em amarelo como resultado da mistura do verde e vermelho. (C) Membrana plasmática marcada com o **CellMask**. (D) Apresenta a morfologia das células no contraste normal do microscópio. As setas indicam a acumulação periférica das sondas na membrana. Barra de escala 10 μm .

Nas células fixadas (Figura 20-II), é possível observar que as membranas nucleares também estão marcadas. Isso ocorre durante o processo de fixação, a integridade da membrana é comprometida devido ao uso de formalina. A marcação da membrana nuclear só é observada em células fixadas.

3.5.2 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio

Reactive Oxygen Species (ROS) são espécies químicas reativas derivadas do oxigênio molecular e que, no contexto biológico, são subprodutos do metabolismo celular.⁹⁰ A presença destas, em grandes quantidades, tem potencial de causar efeitos indesejados na saúde da célula. A presença destas espécies está relacionada com os processos de apoptose,⁹¹ conhecido como morte celular programada.

Para detecção de ROS, utiliza-se a técnica EPR (*electron paramagnetic resonance*).⁹² Para quantificação das espécies reativas formadas, foi usada a sonda CMH[§]. Este composto reage com ROS celular e gera como produto o radical nitróxido (CM*[•]). A quantidade de ROS presente é determinada pela oxidação do CMH, que é medida pelo sinal gerado pela espécie CM*[•], detectado pela EPR.⁹³

Para se quantificar as espécies ROS, foram realizadas as seguintes análises: (i) experimentos de controle para se determinar a quantidade natural de ROS presentes na célula quando nenhum marcador é utilizado; (ii) análises na presença de *N*-acetilcisteína (inibidor de ROS); (iii) análises com menadiona (indutor de ROS); (iv) análises na presença de **BTD-4APOc** em duas concentrações (10 e 100 μ M). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 21 e na Figura S17. Como pode ser observado, apenas o composto menadiona causou alteração significativa na detecção de ROS. **BTD-4APOc** a 10 μ M não induz de maneira significativa a formação destas espécies (comparar com o experimento de controle). A 100 μ M, a situação é diferente. Nesta concentração a quantidade de CM*[•] detectada é maior, mas ainda assim menor do que a quantidade detectada quando se usa o indutor de formação ROS. Este resultado mostra que o composto **BTD-4APOc** não tem efeitos significativos na formação de espécies de oxigênio, não alterando o metabolismo da célula. Desse modo, pode se confirmar a viabilidade de se empregar este composto como marcador fluorescente para mitocôndrias.

[§] (1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametil-pirrolidina).

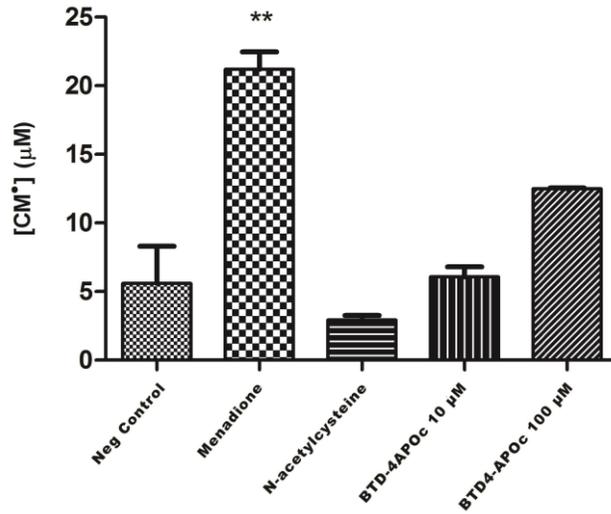


Figura 21. Efeitos da menadiona, *N*-acetilcisteína (NAC) e **BTD-4APOc** na formação de CM* nas células tumorais. A maior concentração de CM* foi observada em células MCF-7 ($p < 0,01$) com menadiona.

4 Conclusão

Por meio dos resultados obtidos neste trabalho pode-se caracterizar a estrutura de quatro novos compostos derivados inéditos do núcleo BTD (**BTD-4AP**, **BTD-4APBu**, **BTD-4APOc** e **BTD-4APBuP**), por meio das técnicas de RMN, IV, ESI-MS, bem como investigar suas propriedades fotofísicas e comportamento solvatocrômicos por meio de análises espectrofotométricas e espectrofluorimétricas.

Os compostos sintetizados neste trabalho foram planejados de modo que pudessem realizar marcações seletivas no meio celular. Suas estruturas foram elaboradas de acordo com conhecimentos prévios da literatura, que acreditava-se já serem bem consolidados. Porém, os resultados aqui obtidos mostram o contrário. Pouco se sabe sobre a relação estrutura-seletividade dos marcadores celulares e muito ainda precisa ser feito até que se possa fazer predições sobre a seletividade no interior de uma célula.

O composto **BTD-4AP** se apresentou disperso pelo citossol, não mostrando nenhuma tendência de preferência de marcação. O composto **BTD-4APBuP** apresentou uma inesperada afinidade pela membrana plasmática, quando na verdade esperava-se uma tendência por mitocôndrias devido à presença do grupo TFF. No entanto este composto apresenta vazamento e não marca exclusivamente essa organela. **BTD-4APOc** se mostrou uma sonda bastante eficiente, marcou seletivamente as mitocôndrias, não induziu produção de ROS na organela e também não apresentou citotoxicidade a baixas concentrações.

Não só a carga e tamanho das cadeias carbônicas importam no planejamento de uma estrutura. É necessário também avaliar a distribuição da carga pela estrutura da molécula, seu raio iônico, sítios de solvatação e eixos de rotação. Acredita-se que para uma maior assertividade em relação à predição estrutura-seletividade, experimentos eletroquímicos e cálculos teóricos devam ser realizados com o objetivo de se determinar os potenciais de oxidação e redução das sondas fluorescentes, bem como a área da nuvem eletrônica e superfície de carga das moléculas.

Capítulo 2

Nanopartículas de Carbono

1 Introdução

O elemento carbono apresenta uma química extremamente rica e versátil. Pode assumir diversos estados de hibridização (sp , sp^2 , sp^3), podendo formar 4 ligações químicas com outros átomos de carbono ou átomos de outros elementos (metálicos ou não metálicos). Esta versatilidade permite a formação de uma variedade de compostos e materiais, de pequenas moléculas como o dióxido de carbono ou metano a estruturas supramoleculares como proteínas e polímeros.

Grafite e diamante são exemplos de materiais compostos essencialmente por átomos de carbono, com hibridização sp^2 e sp^3 respectivamente, e por isso possuem características totalmente diferentes. A diferença das propriedades dos dois materiais se deve à maneira como esses átomos estão organizados e estas mudanças no arranjo estrutural proporciona grandes consequências na família das nanoestruturas de carbono.⁵

As nanoestruturas de carbono podem ser divididas em dois grupos principais. O primeiro grupo envolve estruturas derivadas do grafênicas**. São essencialmente compostas por átomos de carbono sp^2 . Grafeno e os nanotubos pertencem a essa classe, que contém vários outros membros, como os *nanohorns*, *nanoonions*, nanotubos, fulereno e *carbon dots* (Figura 22).⁵ Todos estes nanoalótropos são considerados do mesmo grupo porque consistem basicamente de uma rede de carbono sp^2 com arranjo hexagonal. Esta estrutura em comum significa que possuem características semelhantes, no entanto possuem propriedades com diferenças significativas devido às diferentes formas, tamanhos e organização estrutural de seus átomos. Condutividade térmica, elétrica, assim como leveza e alta resistência mecânica são características bastante positivas destes materiais, tornando-os bastante atrativos para inúmeras aplicações.⁹⁴⁻⁹⁷

** Traduzido do termo *graphenic*.

O segundo grupo consiste em estruturas que possuem majoritariamente átomos de carbono com hibridização sp^3 , e que apresentam regiões amorfas e cristalinas. Até o momento, a única estrutura conhecida deste grupo são os nanodiamantes.⁹⁸

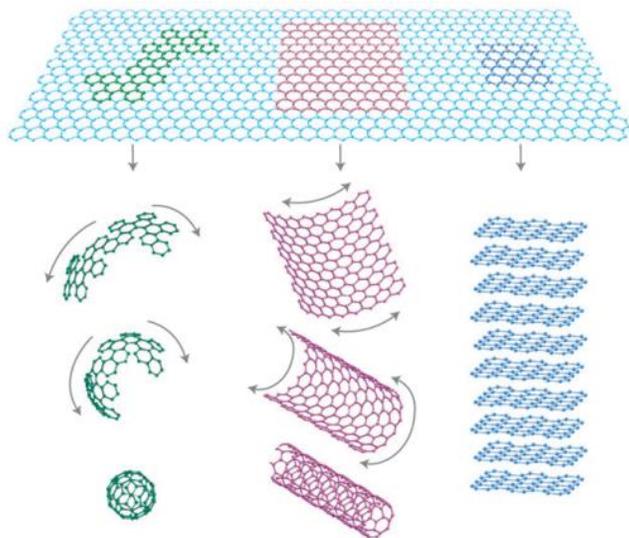


Figura 22. Exemplos de nanoestruturas grafênicas (imagem adaptada da referência ⁹⁹).

2 Revisão bibliográfica

2.1 Nanoestruturas de Carbono

O estudo das nanoestruturas de carbono começou com a descoberta do fulereno em 1985.¹⁰⁰ Durante investigações visando compreender a formação de longas cadeias de carbono no espaço interestelar, amostras de grafite foram vaporizadas por irradiação a laser. Utilizando um espectrômetro de massas para analisar os produtos formados, o resultado foi a detecção de diversos clusters, dentre estes, o mais abundante continha 60 átomos de carbono. Assim foi descoberto o primeiro membro da família dos nanomateriais de carbono, o fulereno C₆₀.

Alguns anos mais tarde, foi relatada a síntese de uma nova estrutura com aspectos tubulares.¹⁰¹ Utilizando o método de arco elétrico (*arc discharge*) no processo de evaporação, percebeu-se o crescimento de agulhas no polo negativo do eletrodo utilizado. A descoberta destes dois materiais chave foi seguida de muitas outras,⁵ levando ao desenvolvimento de uma nova classe de nanoestruturas, a classe dos nanocarbons. A Figura 23 apresenta em ordem cronológica a descoberta destes novos materiais.

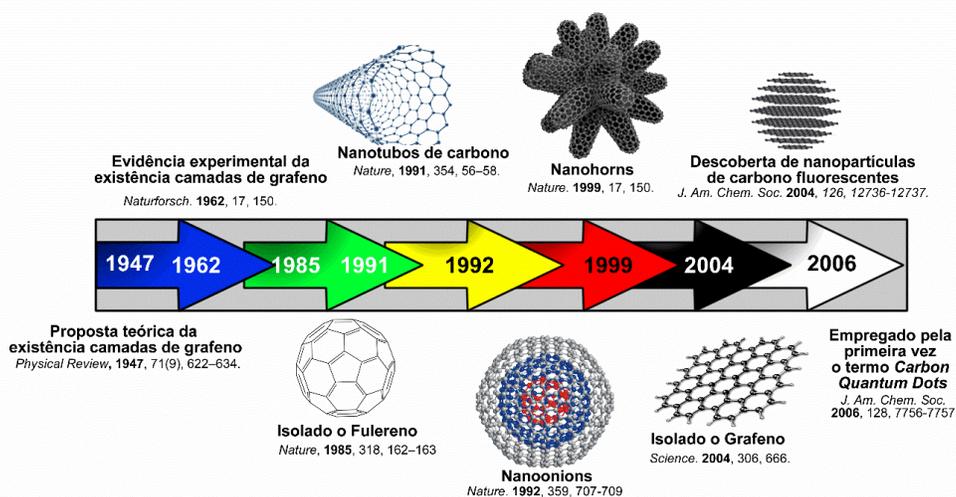


Figura 23. Linha do tempo da descoberta dos materiais membros da classe dos carbonáceos nanométricos.

Dentre os nanomateriais descobertos, o que mais recebeu atenção foi o grafeno. Sua existência já havia sido prevista em 1947,¹⁰² mas só foi possível isolá-lo em 2004.¹⁰³ Ainda no mesmo ano, o grupo do Professor Scrivens relatava que durante o processo de purificação de nanotubos de carbono, um material nanoparticulado fluorescente havia sido isolado.¹⁰⁴ Este novo material, dois anos depois, passaria a ser chamado de *Carbon Dot* (C-dots).¹⁰⁵

C-dots são nanopartículas quase-esféricas de carbono com tamanhos menores que 10 nm e apresentam propriedades fotoluminescentes, tornando-os bastante atrativos para tecnologias de luz.¹⁰⁶ Possuem em sua estrutura domínios de carbono sp² e grupos carboxilas e hidroxilas em sua superfície, o que lhes confere um elevado caráter hidrofílico. O teor de oxigênio, a cristalinidade e as propriedades fotoluminescentes das partículas variam de acordo com o método de síntese utilizado.^{13,106,107}

2.2 Nanopartículas de carbono. *Carbon dots* vs *Graphene Dots*

Dentre os vários trabalhos publicados que tratam sobre os *Carbon dots*,^{108,109} as características que todos possuem em comum são o tamanho das partículas obtidas (<10 nm), a composição química das partículas obtidas (alto teor de oxigênio ~50%) e o fato de serem fotoluminescentes. No entanto, por causa dos inúmeros métodos de síntese e diferentes substratos que podem ser utilizados na obtenção deste material, as partículas sintetizadas por diferentes grupos de pesquisa apresentam diferenças bem evidentes entre si.^{110,111}

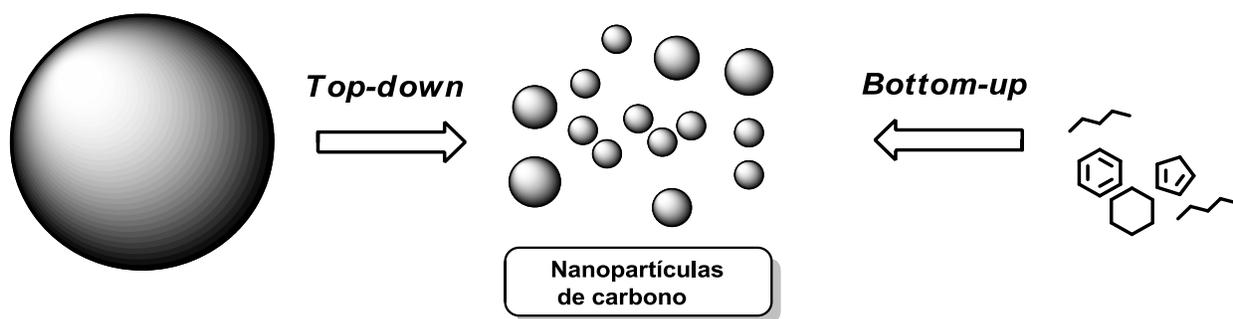
Nos diversos trabalhos publicados, os termos *carbon dots* (C-dots), *carbon quantum dots* (CQDs), *carbon nanodots* (CNDs), *graphene nanodots* (GNDS) são empregados. Contudo, a distinção entre eles não é clara e muitas vezes são utilizados de maneira errônea.² Para facilitar a compreensão deste trabalho, apresentaremos algumas definições com o objetivo de deixar mais clara a diferença entre os diversos tipos de materiais existentes.

Fundamentalmente, todos os trabalhos tratam sobre nanopartículas de carbono fotoluminescentes que podem ser classificadas em diferentes categorias. O termo *carbon dot* é mais abrangente e, de maneira geral, pode se referir a vários tipos de

nanoestruturas, estendendo-se aos materiais com e sem planos cristalinos e que possuem diversos grupos funcionais em suas estruturas. A definição comumente encontrada na literatura científica diz que os C-dots são nanopartículas de carbono com morfologia quase-esférica, possuem pelo menos uma dimensão menor do que 10 nm e apresentam propriedades luminescentes.¹⁰⁶ Os GNDs são constituídos por fragmentos de folhas de grafeno confinados nas dimensões *x-y*, dispostos em camadas conectadas por meio de interações intermoleculares (a natureza dessas interações será discutida nas seções posteriores).¹⁰⁸ Desta maneira, os GNDs são uma subcategoria dos C-dots, que por sua vez são uma subcategoria das nanopartículas de carbono.²

2.2 Métodos de Síntese

Os métodos de obtenção são divididos em *top-down* e *bottom-up* (Esquema 3). No primeiro, os C-dots são formados pela quebra de uma estrutura de carbono supramolecular, por exemplo oxidação de carvão vegetal. Quando formados por precursores moleculares, diz-se que foram obtidos via *bottom up*. Podem ser obtidos a partir de qualquer material orgânico. São encontrados os mais variados exemplos, de cabelo humano, cascas de frutas, fuligem e rejeitos bovinos. A Tabela 3 apresenta alguns exemplos encontrados na literatura.



Esquema 3. Processos *top-down* e *bottom-up* para síntese dos carbon dots.

Uma rota bastante utilizada para produção destas nanopartículas é realizada por meio do tratamento com ácido nítrico. O processo oxidativo tem por função a (i) quebra dos agregados carbonáceos em partículas menores, levando à formação de partículas de diversos tamanhos; (ii) confere caráter hidrofílico às partículas produzidas, uma vez

que insere grupos funcionais oxigenados na superfície dos materiais, como hidroxilas, carbonilas e carboxilas.¹⁰⁶ A presença destes grupos funcionais confere alta solubilidade a estes materiais, característica bastante desejável para aplicações biológicas, além de serem sítios químicos bastante versáteis para posteriores reações de funcionalização e modificação de superfície das partículas.

Tabela 3. Exemplos de materiais precursores usados na síntese de C-dots.

Precursor	Síntese	Aplicação	Ano/referência
Ovo de Galinha	Irradiação com Plasma	Tinta	2012 ⁽¹¹²⁾
Fuligem	Oxidação (HNO ₃)	Bioimageamento	2009 ⁽¹¹³⁾
Fibra Capilar	Oxidação (HSO ₄)	Bioimageamento	2013 ⁽¹¹⁴⁾
Líquido Iônico	Microondas	Sensor	
Plantas	Tratamento Hidrotérmico	Sensor Cu ²⁺	
Bagaço de Malte	Carbonização/Oxidação	Bioimageamento	2015 ⁽¹¹⁵⁾
Ácido Ascórbico	Tratamento Hidrotérmico (90 °C)	Sensor pH	
Esterco	Oxidação (HNO ₃)	Bioimageamento	2015 ⁽¹¹⁶⁾

2.3 Modificação dos C-dots

Os métodos de funcionalização modificam quimicamente os C-dots. Estes métodos consistem no uso de reações de química orgânica clássica para a modificação e introdução de novos grupos funcionais.¹¹⁷⁻¹¹⁹

A metodologia mais simples para incorporação de grupos funcionais nos C-dots é o tratamento oxidativo com ácidos.^{110,120} Neste processo, diversos grupos funcionais como hidroxilas, carbonilas, epóxidos e carboxilas são introduzidos na superfície. A introdução destes, confere aos C-dots solubilidade em meio aquoso e possibilita inúmeras outras modificações químicas.

Uma das modificações mais comumente empregada consiste no processo de formação de amidas. Neste procedimento, as reações são realizadas com a utilização de cloreto de tionila, para formação do cloreto de acila, em seguida é empregado o

agente de amidação, normalmente uma amina de cadeia longa. Outra maneira comumente utilizada é via ativação das carboxilas com carbodiimidas.¹²¹⁻¹²⁴

O primeiro trabalho de modificação química dos C-dots, com o emprego de reações orgânicas clássica foi realizado em 2009.¹²⁵ Neste trabalho, os C-dots foram tratados com cloreto de tionila e amidados com etilenoglicol oligomérico diaminado ($\text{H}_2\text{NCH}_2(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{35}\text{C}_2\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}_2$).

Trabalhos com o uso do intermediário cloreto de acila para amidação com outras aminas também são reportados. Substratos como azul de metileno,¹²⁶ anilina,¹²⁶ etilenodiamina,¹¹⁶ imidazol,¹²⁷ amino-benzotiadiazolas, são alguns exemplos de aminas utilizadas.

A obtenção de materiais funcionalizados pode ser realizada de outras maneiras, que não por vias “químicas”. Métodos de uma única etapa também tem sido bastante explorados para essa finalidade. A pirólise em conjunto de diferentes substratos é uma maneira,¹²⁸ a decomposição via reações de micro-ondas é outra.¹²⁹

2.4 Redução de Superfície

A estrutura, morfologia e cristalinidade destes materiais variam enormemente dependendo do método de síntese e do material de partida. Apesar disso, independentemente do método utilizado, algumas características em comum são observadas: (i) a presença de grupos carboxilas; (ii) propriedades fotoluminescentes; (iii) solubilidade em água.

Fotoluminescência é uma propriedade inerente aos C-dots, podendo apresentar maior ou menor rendimento quântico e emissão dependente da excitação.¹²⁰ De acordo com vários estudos, essas propriedades estão associadas à presença dos grupos funcionais, grupos aromáticos e defeitos presentes nestes materiais.¹³⁰ Portanto a manipulação destes grupos é uma maneira de se alterar suas propriedades luminosas.

Um dos empregos da síntese orgânica clássica na química dos C-dots envolve o uso de agentes redutores.^{111,131} Ao se fazer o uso destes agentes, a superfície dos C-dots é reduzida e os resultados desta transformação são bastante interessantes.

Assim como no óxido de grafeno, os grupos funcionais presentes nos C-dots também se encontram nos domínios de carbono sp^2 .^{132,133} O processo de redução elimina esses grupos e defeitos de superfície, restaurando parte da aromaticidade do sistema (Figura 24).¹³⁴

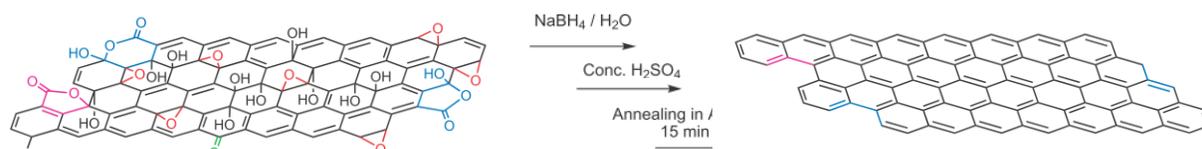


Figura 24. Exemplo de processo de redução de superfície do óxido de grafeno (adaptada referência ¹³⁴).

Borohidretos, hidreto de alumínio e lítio, ácidos halogenídricos, metais alcalinos, aminoácidos, hidrazina, micro-organismos, aminas orgânicas, fenil hidrazina, benzilamina, sais inorgânicos como $NaHSO_3$ são alguns exemplos de agentes químicos utilizados na redução do óxido de grafeno.¹³⁵ Diferentes métodos de redução resultam em materiais com diferentes propriedades.

O primeiro estudo dos efeitos do processo de redução nos C-dots é de 2011.¹¹¹ Neste trabalho, foram testados vários redutores como hidrazina, ácido ascórbico, sulfeto de sódio, citrato de sódio e cloreto de hidroxilamina, sendo que nenhum destes substratos foi capaz de modificar as propriedades fotoluminescentes. Mudanças no espectro de emissão dos C-dots foram obtidas apenas após o uso de $NaBH_4$. Foi observado um aumento na intensidade de emissão e deslocamento hipsocrômico no espectro de fluorescência do material. Verificou-se também, uma nova banda de absorção em 280 nm no espectro de UV-Vis e o tempo de vida da luminescência aumentou. Análises de FTIR sugerem que os grupos carboxilas e epóxidos foram seletivamente reduzidos a hidroxilas, deixando inalteradas as carboxilas e ligações $C=C$.

Outro trabalho relacionado à investigação das propriedades fotoluminescentes dos C-dots foi realizado por Yan, na Academia de Ciências Chinesa, em 2013. No estudo, foram obtidas partículas a partir de pó de grafite, utilizando o método de Hummer.¹³⁶ O

processo de redução foi realizado com hidrato de hidrazina e devido às mudanças estruturais causadas pelo processo redutivo, foram reportadas mudanças nos espectros de absorção e emissão.¹³¹

No trabalho de Qu foi utilizado um método de redução fotoquímico com o emprego de isopropanol como agente redutor. A vantagem do método é a não utilização de agentes químicos potencialmente tóxicos, como borohidreto de sódio e hidrazina. Como resultado, os C-dots reduzidos com este método apresentaram menor citotoxicidade e foram absorvidos de maneira mais eficiente pelas células em estudos de Bioimageamento.¹³⁷

Muitos outros trabalhos podem ser encontrados, com diferentes metodologias, mas apresentando resultados similares como maior intensidade no espectro de emissão, e com conseqüente aumento do rendimento quântico das nanopartículas.^{137,138}

2.5 Fotoluminescência dos C-dots

A fluorescência apresentada pelos C-dots é a principal característica deste nanomaterial. Foram descobertos, de maneira acidental, por apresentarem resposta fotoluminescente ao serem irradiados com luz ultravioleta.¹⁰⁴ Sua fotoluminescência combinada à sua baixa toxicidade e baixo custo de obtenção os tornam bastante promissores para aplicações em tecnologias de detecção de analitos de interesse.¹³⁹⁻¹⁴²

C-dots apresentam forte absorção na região do ultravioleta (260-380 nm), sendo capazes também de absorver luz na região do visível. Foi observado que os comprimentos máximos de absorção variam de acordo com os métodos de síntese. Materiais obtidos a partir de ablação a *laser* apresentaram absorção em 280 nm.¹⁴³ C-dots produzidos por métodos eletroquímicos apresentaram absorção em 270 nm.¹⁴⁴

As absorções em 230 nm são atribuídas a transições $\pi-\pi^*$ dos anéis aromáticos dos domínios de carbono sp^2 .¹³⁰ As absorções em comprimentos de onda maiores são atribuídas a transições do tipo $n-\pi^*$ de grupos carbonílicos presentes na superfície dos materiais.^{145,146}

Os espectros de emissão desses compostos são bem definidos e apresentam comportamento dependente do λ de excitação, isto é, a emissão depende da excitação, propriedade comum a estas partículas.¹⁰⁶ C-dots apresentam grandes deslocamentos de Stokes, aproximadamente 150 nm, no entanto este valor pode variar de amostra para amostra e diminuir com o aumento do λ de excitação. Existem trabalhos divergentes, que relatam a obtenção de partículas que apresentam emissões independentes.^{147,148}

O mecanismo de emissão radiativa destes materiais não é completamente compreendido e as explicações existentes na literatura vão em diferentes direções.² Duas propostas são mais amplamente discutidas. A primeira está relacionada a transições que ocorrem devido à presença das extensas redes de conjugação π presentes nos domínios de carbonos sp^2 e envolve a existência de defeitos na superfície. A segunda proposta está relacionada ao confinamento quântico das partículas, efeito bastante comum em *Quantum Dots* metálicos.¹³

Os resultados encontrados na literatura são divergentes, no entanto os estudos realizados não usam métodos nem substratos padronizados. Diferentes grupos de pesquisas utilizam diferentes materiais de partida e métodos de síntese. Temperatura, concentração, distribuição do tamanho das partículas em solução e pH, frequentemente não são levados em consideração em muitos dos estudos encontrados na literatura. O que certamente gera resultados e conclusões divergentes.

Há trabalhos que também relatam sobre o processo de *Up-conversion*¹⁴⁹ nos C-dots, o deslocamento de Anti-Stokes. Neste processo, ocorre a absorção de energia em comprimentos de ondas maiores e em seguida a emissão em comprimentos de onda mais energéticos.^{115,146,150} No entanto, já foi verificado em outros trabalhos que muitas vezes os relatos sobre *Up-conversion* são errôneos. Na verdade, ocorre um processo de fotoluminescência comum, mas causado por uma excitação de difração de segunda ordem do feixe de luz de excitação.¹⁵¹

2.6 Formação de agregados

Os *carbon dots* são facilmente dispersos em meio aquoso devido ao seu caráter altamente hidrofílico, consequência da presença dos grupos funcionais contendo oxigênio em sua superfície.¹⁰⁶ Soluções destas partículas são de caráter coloidal^{152,153} e apresentam elevada estabilidade. No entanto, quando na presença de eletrólitos, as soluções destas partículas podem coalescer devido à formação de agregados.

As propriedades de cinética de agregação e estabilidade em solução de materiais como fulereno e nanotubos de carbono já foram bastante estudadas.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Estudos sobre comportamento de óxido de grafeno em solução são mais recentes,^{157,158} mas ainda assim, são pouco abundantes na literatura. Estudos sobre o comportamento dos C-dots em solução e suas propriedades de agregação são ainda mais escassos.¹⁵⁹ Pouco se sabe ainda sobre como estas nanopartículas se comportam e interagem em solução e como essas interações afetam suas propriedades espectroscópicas.

De acordo com os resultados obtidos para os outros membros da família dos nanocarbonos, a estabilidade da solução destas materiais depende fortemente da força iônica, do pH da solução e das características da superfície das nanopartículas. Como esses materiais apresentam semelhanças estruturais entre si, como a extensa rede de conjugação π e a presença de grupos funcionais contendo oxigênio na superfície, acredita-se que os mesmos fatores também devem afetar a estabilidade dos C-dots em solução.

Análises de potencial Zeta (ζ) apontam que os C-dots possuem potencial de superfície negativo quando dispersos em água.¹⁶⁰ Isto pode ser consequência da ionização dos grupos carboxílicos e hidroxilas.¹⁶¹ Desta forma, a estabilidade coloidal destes materiais pode também ser decorrente da repulsão eletrostática entre as partículas.

Para compreender como estas partículas interagem em solução, é necessário primeiro considerar a natureza das interações intermoleculares que podem existir entre elas. Os C-dots são nanopartículas com extensas redes de carbonos sp^2 e grupos funcionais como carboxilas e hidroxilas em sua superfície, portanto é de se esperar que

estas partículas possam interagir por meio de ligações de hidrogênio¹⁶² e também por interações π -stacking.¹⁶³⁻¹⁶⁶

De acordo com propostas encontradas na literatura, durante o processo de estruturação dos C-dots, os domínios de carbonos sp^2 formam camadas de carbono que se arranjam de maneira ordenada, formando nanopartículas esféricas.^{167,168} Desta maneira, os C-dots podem ser esquematicamente retratados como aglomerados nanoestruturados concêntricos, conforme representado na Figura 25.

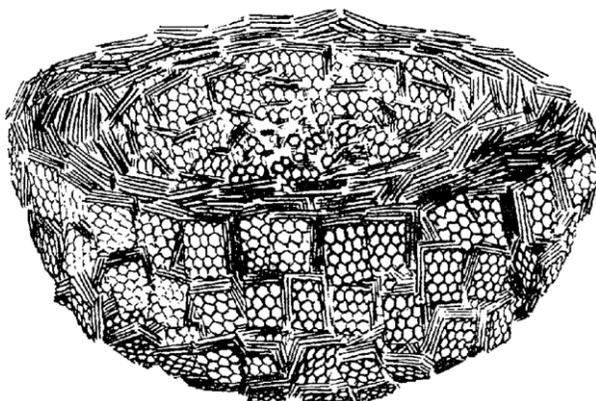


Figura 25. Representação da proposta esquemática da estrutura dos aglomerados dos C-dots (Imagem adaptada da referência¹⁵³).

2.7 Bioimageamento

Os primeiros relatos utilizando os C-dots em experimentos de Bioimageamento datam de 2007. Células cancerígenas MCF-7 foram encubadas com C-dots em uma solução tampão a 37 °C. As células foram irradiadas com pulsos de *laser* de 800 nm. Os compostos apresentaram forte sinal de luminescência na membrana celular e no citoplasma, e foram incapazes de se infiltrar no núcleo. O processo de absorção dos C-dots pelas células se mostrou dependente em relação à temperatura. Em temperaturas abaixo de 4 °C nenhuma absorção foi observada.¹⁶⁹

Em 2013, C-dots sintetizados a partir de rejeitos bovinos, utilizando o método de oxidação com ácido nítrico, foram posteriormente funcionalizados com etilenodiamina e testados como sondas celulares.¹¹⁶

Tabela 4. Métodos de obtenção, precursores de C-dots e resultados em experimentos de Bioimageamento.

Agente passivação	Precursor	Síntese	Afinidade	Tamanho Médio (nm)	$\lambda_{ex}(nm)$	Ano/ref
PEG _{1500N}	grafite	Ablação a laser	Membrana/Cito plasma		800,0	2007 ⁽¹⁶⁹⁾
-	Fuligem	Oxidação HNO ₃ 5M	-	2-6	~ 400,0	2009 ⁽¹¹³⁾
Azul de Metileno	Fuligem	Oxidação HNO ₃ 5M	Detecção DNA	1,4	467	2011 ⁽¹⁷⁰⁾
TTDDA	Glicerol	MW	Detecção DNA	3,5	405, 488, 543	2011 ⁽¹⁷¹⁾
Fluoresceína	Ácido Cítrico	Térmico	pH	5		2012 ⁽¹⁷²⁾
	Cabelo	Ultrassom	Membrana/Cito plasma	7.5	405,0	2013 ⁽¹¹⁴⁾
	Polietileno	H ₂ SO ₄	Nucléolo	4		2014 ⁽¹⁷³⁾
	Glicol	Refluxo NaOH				
PEG _{1500N}	Carvão Ativo	Oxidação HNO ₃ 5M	Membrana/Cito plasma	~5	458	2015 ⁽¹⁷⁴⁾
Etilenodiamina	Estrume	Oxidação HNO ₃ 5M	Nucléolo	5		2015 ⁽¹¹⁶⁾
3-H ₂ NPhB(OH) ₂	Ácido Cítrico	MW	Glicose	2-5	450, 551	2015 ⁽¹⁷⁵⁾

2.8 Aplicações Fotocatalíticas

Devido às suas capacidades elétron doadoras e aceptoras e baixo custo de obtenção, os C-dots tem se mostrado uma alternativa viável em aplicações de Fotocatálise.

2.8.1 Water Splitting

Os C-dots têm sido investigados também na obtenção de gás hidrogênio a partir da molécula de água. As investigações consistem principalmente nos métodos fotoelétrico e fotocatalítico. No primeiro, há um circuito externo e um gerador de voltagem para a produção de H₂. O segundo, os sistemas fotocatalíticos, consistem em um sistema em que um material semiconductor, o fotocatalisador disperso em meio aquoso, é irradiado

com luz solar. E por meio dos processos eletrônicos decorrentes da absorção de fótons, H₂ é formado.

O primeiro trabalho relatando a obtenção de gás hidrogênio utilizando C-dots foi publicado em 2014, por Zhang e colaboradores. Os autores sintetizaram C-dots modificados com P25 e TiO₂ por métodos hidrotérmicos. Testaram o material como semicondutor na produção de H₂ e concluíram que o compósito se comportava de diferentes maneiras, dependendo do comprimento de onda utilizado. Quando irradiado com luz ultravioleta, os C-dots agem como reservatórios para os elétrons fotoexcitados provenientes do P25, resultando na separação do par elétron-buraco gerado. Esta separação tem efeito positivo, aumentando a atividade catalítica do material. Utilizando a luz visível os C-dots agem como fotosensibilizadores. Neste caso, os elétrons excitados são provenientes das nanoestruturas de carbono.

Além destes sistemas híbridos, C-dots puros, sem a presença de metais, também tiveram suas propriedades fotocatalíticas investigadas. Materiais dopados com átomos de nitrogênio são também interessantes para aplicações em fotocatalise. A utilização de matéria orgânica na obtenção das nanoestruturas é um método bastante eficiente para a síntese de materiais dopados. Há trabalhos na literatura que relatam a utilização de cabelo,¹⁷⁶ camarão e até mesmo de esterco.¹¹⁶

Trabalhos relatando o processo de *water splitting* com C-dots puros são mais raros. Zhu, da Universidade da Academia de Ciências Chinesas, foi o primeiro a reportar a evolução de gás hidrogênio utilizando apenas água destilada e C-dots obtidos por meio do tratamento hidrotérmico em ultrassom. Na otimização das condições e com uso de agentes redutores, a atividade obtida foi 30 vezes maior quando comparada ao sistema.

2.8.2 Fotocatálise Orgânica

Um dos principais problemas encontrados pela indústria química são as condições severas em que muitos processos são realizados. Pressões e temperaturas muito elevadas, bem como longos tempos reacionais são alguns dos exemplos dos problemas enfrentados e que levam a grandes gastos energéticos, financeiros e ambientais.

Encontrar maneiras de realizar esses processos de forma mais econômica, é, portanto, o foco das investigações de muitos pesquisadores.

Os C-dots são capazes de liberarem prótons quando irradiados com fótons.¹⁷⁷ Esta propriedade permite que estes materiais sejam usados como catalisadores em reações de catálise ácida, tais como: esterificações, rearranjo de Beckmann e condensações aldólicas.

A oxidação de hidrocarbonetos e álcoois são exemplos de reações orgânicas muito dispendiosas utilizadas na indústria. Recentemente, demonstrou-se a oxidação do álcool benzílico a benzaldeído utilizando C-dots e luz infravermelha. Neste trabalho, a conversão obtida foi de 92% com 100% de seletividade ao se usar luz infravermelha. Ao se usar luz ultravioleta, o álcool era oxidado para ácido benzoico. Demonstrando novamente o diferente comportamento dos C-dots ao se utilizar diferentes comprimentos de onda.¹⁷⁸

C-dots apresentaram também resultados promissores em reações de condensação aldólica. Este tipo de reação pode ser promovida por catálise ácida ou por meio de interações químicas não covalentes, como as ligações de hidrogênio. Os grupos hidroxilas presentes nos C-dots podem promover este tipo de interação. Os resultados obtidos demonstraram que a eficiência do catalisador era maior quando a luz visível era utilizada.¹⁷⁹

3 Objetivos

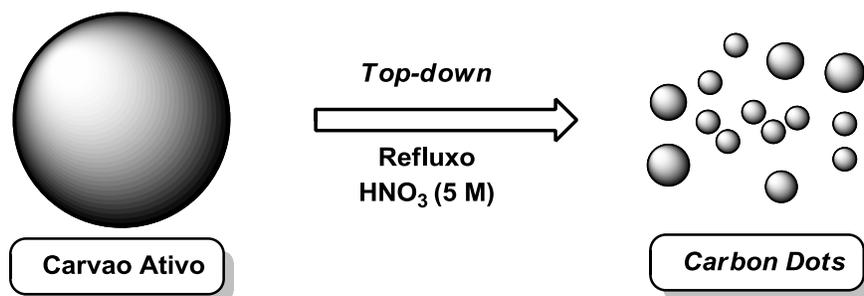
Este trabalho tem como proposta a produção e caracterização de *carbon dots*. Pretende-se avaliar a estrutura e as propriedades do material através de técnicas como microscopia eletrônica de transmissão (MET), infravermelho (FT-IR), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), ressonância magnética nuclear (RMN) e ultravioleta-visível (UV-Vis) de modo que sua estrutura possa ser caracterizada e os seus mecanismos de decaimento radiativo melhor elucidados.

- 1- Obter C-dots a partir de fonte com elevado teor de carbono, o Carvão Ativo (CA);
- 2- Estudar suas propriedades fotofísicas;
- 3- Investigar o efeito da concentração e do pH nas suas propriedades em solução.

4 - Resultados e discussões

4.1 Síntese e caracterização dos *Carbon Dots*

Os *Carbon Dots* obtidos neste trabalho foram sintetizados por meio de metodologia *top-down*. Carvão ativo comercial foi refluxado em uma solução de ácido nítrico 5 M por 24 horas (**Esquema 4**)^{110,180} O tratamento com ácido nítrico tem como objetivo romper os fragmentos carbonáceos de maior tamanho que constituem o carvão em partículas menores. Durante o procedimento de fragmentação, as partículas também são oxidadas, levando à formação de grupos funcionais ricos em oxigênio em sua superfície. A presença destes grupos confere um caráter altamente hidrofílico aos *Carbon Dots*.¹⁰⁶



Esquema 4. Processo *top-down* para síntese dos *Carbon Dots* com ácido nítrico.

A formação das nanopartículas foi confirmada por meio de análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens obtidas (Figura 26) mostram que as partículas possuem morfologia quase-esférica e tamanhos variados, de 10 a 100 nm, e tem uma tendência de se aglomerarem.^{181,182}

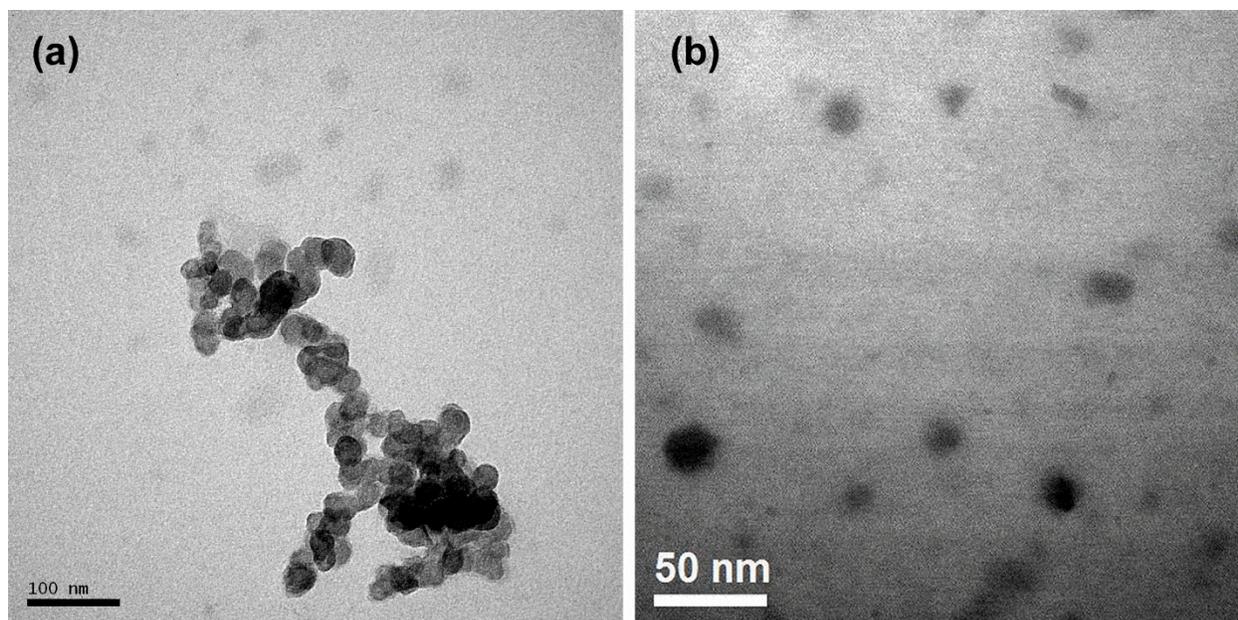


Figura 26. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (a) 120 kV e (b) 200 kV dos C-dots sintetizados.

A confirmação do processo oxidativo se deu primeiro por meio de análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (Figura 27). Comparando-se os espectros do material de partida e do produto final, é possível notar a presença de ligações **C=O**, **C-O** e **O-H** em maior abundância. No espectro do carvão ativo é possível observar a presença de absorções de vibrações de ligações **O-H** e **C-O** localizadas em 3402 cm^{-1} e 1089 cm^{-1} , respectivamente. No espectro dos *Carbon Dots*, as fortes absorções em 1706 cm^{-1} e em 1218 cm^{-1} ocorrem devido à maior presença das ligações **C=O** e **C-O**, respectivamente, geradas durante o tratamento oxidativo. É possível verificar também absorções intensas em 1630 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} , proveniente de ligações **C=C** dos grupos aromáticos. A absorção em 1334 cm^{-1} é característica de ligações (**C-O-C**), sugerindo a existência de grupos éteres e epóxidos.¹³²

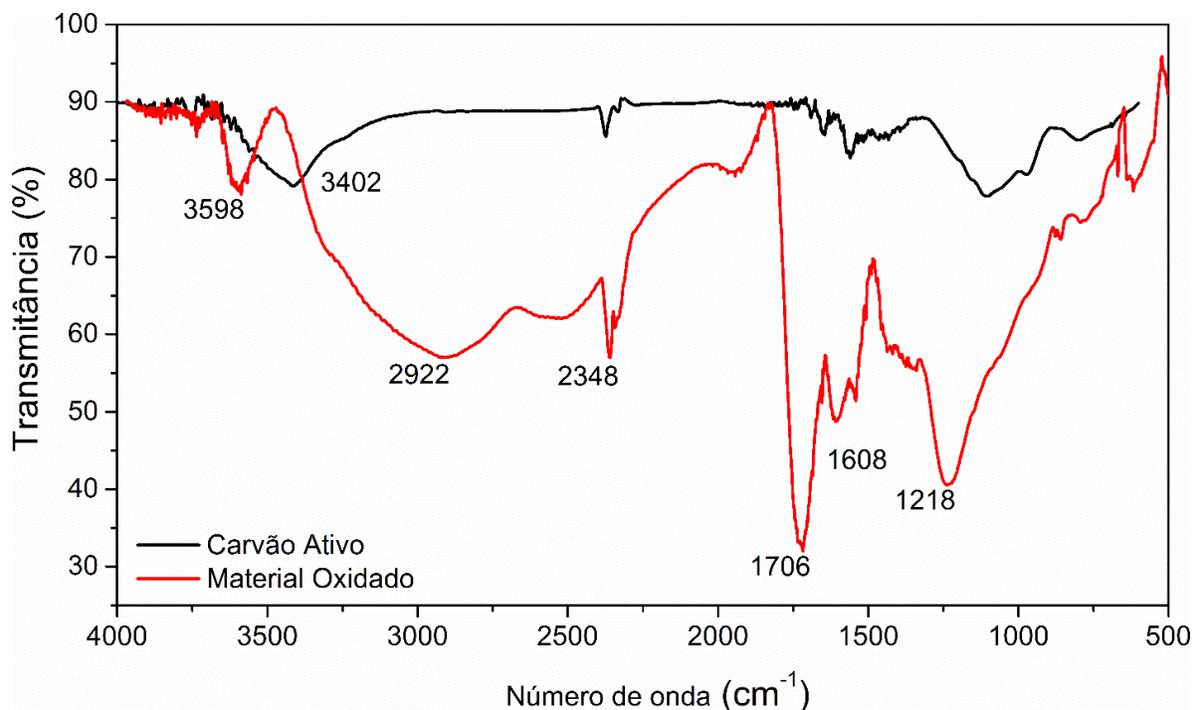


Figura 27. Espectro de IV do material de partida Carvão Ativo (preto) e do produto final, *Carbon Dots* (vermelho).

Para uma investigação estrutural mais informativa, análises de XPS foram realizadas (Figura 28). Os espectros obtidos também indicam a presença de carbono (C 1s, 284 eV) e oxigênio (O 1s, 532 eV) na superfície de ambos os materiais. Comparando-se os espectros do material de partida com o do produto final (Figura 28a), é possível verificar que no material oxidado há uma quantidade de oxigênio muito maior do que no material de partida. No espectro do carvão ativo, a intensidade da componente do carbono é muito maior do que a de oxigênio. Depois de oxidado, o material passa a apresentar maior proporção de átomos de oxigênio com relação aos átomos de carbono. Este resultado indica a presença de maior quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio, demonstrando a eficiência do tratamento oxidativo.

No espectro de alta resolução, na região de C 1s do material oxidado (em vermelho na Figura 28b, é observada uma componente que não está presente no espectro do material de partida (em preto na Figura 28 b). Esta componente se alonga

para a região de maior energia do espectro, região característica de átomos de carbono mais oxidados ligados a átomos de oxigênio.¹⁸³

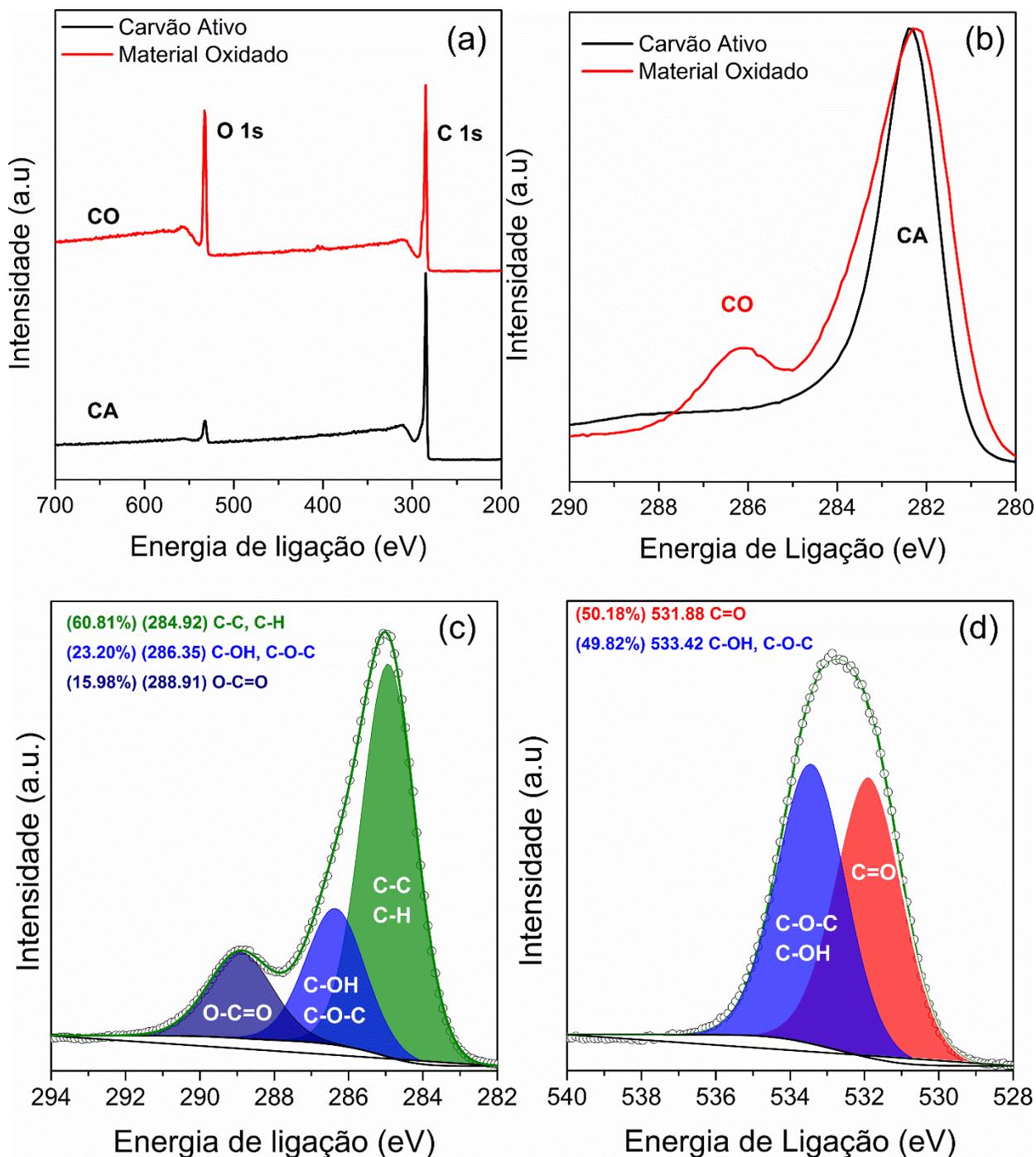


Figura 28. Espectros de XPS dos *Carbon Dots* (vermelho) e do carvão ativo (preto) (a). Espectros de Alta Resolução do C 1s dos *Carbon dots* (vermelho) e do carvão ativo (preto) (b). Espectros de alta resolução deconvoluídos de C 1s (c) e O 1s (d).

O espectro de alta resolução de C 1s (Figura 22C) pode ser deconvoluído em três componentes localizadas em 284,9 eV (60,8%), 286,3 eV (23,2%), 288,9 eV (15,9%), que são atribuídas a ligações do tipo (**C=C, C-H**), (**C-OH, C-O-C**), (**O-C=O**) respectivamente. Enquanto o espectro de alta resolução do O 1s apresenta duas componentes. A primeira localizada em 531,9 eV (50,1%) e a segunda em 533,4 eV (49,8%). As componentes são atribuídas a ligações do tipo (**C=O**) e (**C-OH, C-O-C**) respectivamente.

Os dados coletados nestes experimentos corroboram com as informações obtidas na Espectroscopia de IV e com os dados de CHN, (C 73,3%, H 1,8% e O 24,7% para o material de partida) e (C 51,3%, H 1,7% e O 45,9% para os *Carbon Dots*), (Tabela S1. As análises de XPS, IV e CHN indicam a presença de grupos funcionais contendo oxigênio na superfície e no interior das partículas. Entretanto, estas técnicas nos dizem que os grupos estão presentes na composição do material, mas não permitem diferenciar de maneira mais refinada o arranjo estrutural desses grupos. Considerando que estes podem compor a estrutura dos *Carbon Dots* de diferentes maneiras,¹³⁵ mais informações a respeito do arranjo estrutural se fazem necessárias para uma elucidação mais detalhada.

Informações obtidas por meio da técnica de RMN podem auxiliar na investigação da estrutura dos *Carbon Dots*. Esta técnica é uma poderosa ferramenta para a elucidação de estruturas orgânicas, fornecendo informações sobre os tipos de átomos e a densidade eletrônica sobre estes, além de também propiciar informações sobre seus ambientes químicos. A espectroscopia de RMN ¹³C pode auxiliar no processo de investigação estrutural dos *Carbon Dots*,^{120,138,180} fornecendo informações sobre o estado de hibridização dos seus átomos. Experimentos APT (experimento unidimensional de carbono) podem facilmente diferenciar átomos de carbono zero (C zero), CH, CH₂ e CH₃. Realizando este experimento para os *Carbon Dots* (Figura 29), percebe-se a presença de sinais em 30, 50 e 60 ppm (Figura 29 d, e). Estes sinais indicam a presença de átomos de carbono alifáticos (sp³) ligados a átomos de oxigênio. Provavelmente, grupos metóxi (-O-CH₃) em diferentes ambientes químicos.

Acima de 120 ppm, duas regiões principais podem ser observadas. A primeira, entre 120 e 150 ppm (Figura 29c), característica de átomos de carbono aromáticos (sp^2), apresenta uma série de sinais referentes aos átomos de carbono zero (C Zero) e alguns poucos sinais referentes a carbonos ímpares (CH), estes sinais podem ser atribuídos aos átomos que constituem os domínios de carbonos sp^2 aromáticos e também a átomos de carbono aromáticos ligados a grupos metóxi.

Na segunda região, entre 160 e 180 ppm (Figura 29b), característica de átomos desblindados, há uma série de sinais referentes aos átomos de carbono quaternários, muito provavelmente ligados a átomos de oxigênio, podendo ocorrer devido à presença de grupos fenólicos, cetônicos e carboxílicos.¹²⁰

Esta variedade de átomos de carbono evidencia a presença de diversos grupos funcionais na estrutura dos *Carbon Dots*. Os resultados desta análise são similares aos resultados obtidos por outros grupos de pesquisa.^{120,138}

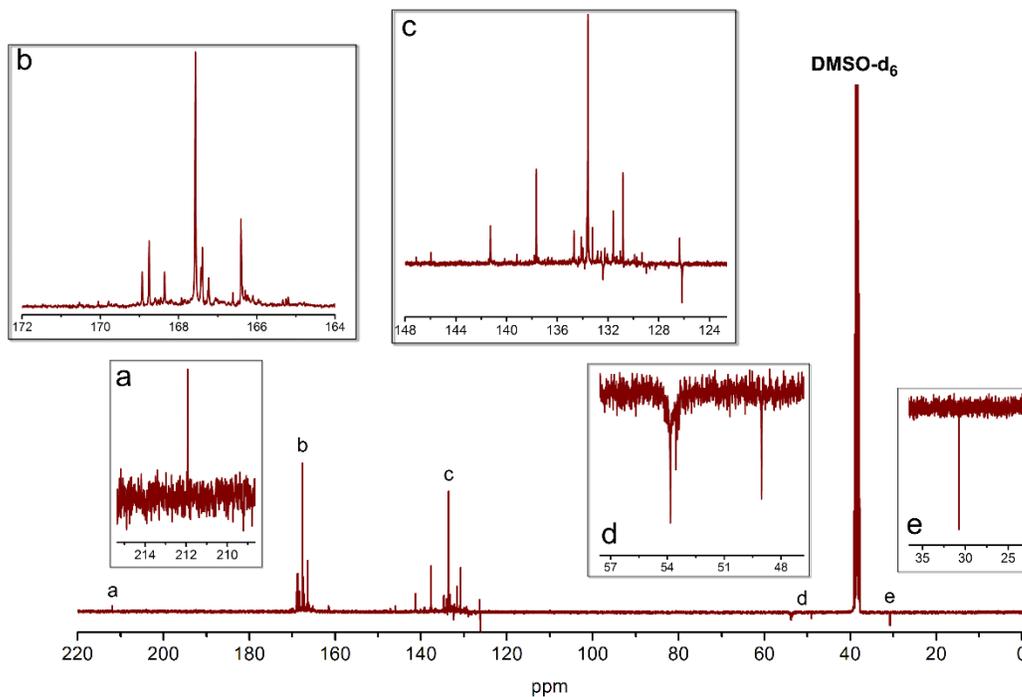


Figura 29. Espectro de APT (100 MHz) dos *Carbon Dots* em DMSO- d_6 .

Os dados obtidos nesta análise estão de acordo com os resultados da IV e XPS, indicando a presença de grupos funcionais como éteres e epóxidos (**C-O-C**), carboxilas (**-COOH**), carboxilatos (**-COO⁻**), hidroxilas (**-OH**) de álcoois e fenóis e carbonilas (**C=O**) de grupos acetonas, lactonas, anidridos, estéres. Estes resultados demonstram a complexidade estrutural dos sistemas *Carbon Dots*, e com base nestas informações e no trabalho de outros grupos, uma estrutura genérica para as nanopartículas é sugerida (Figura 30).

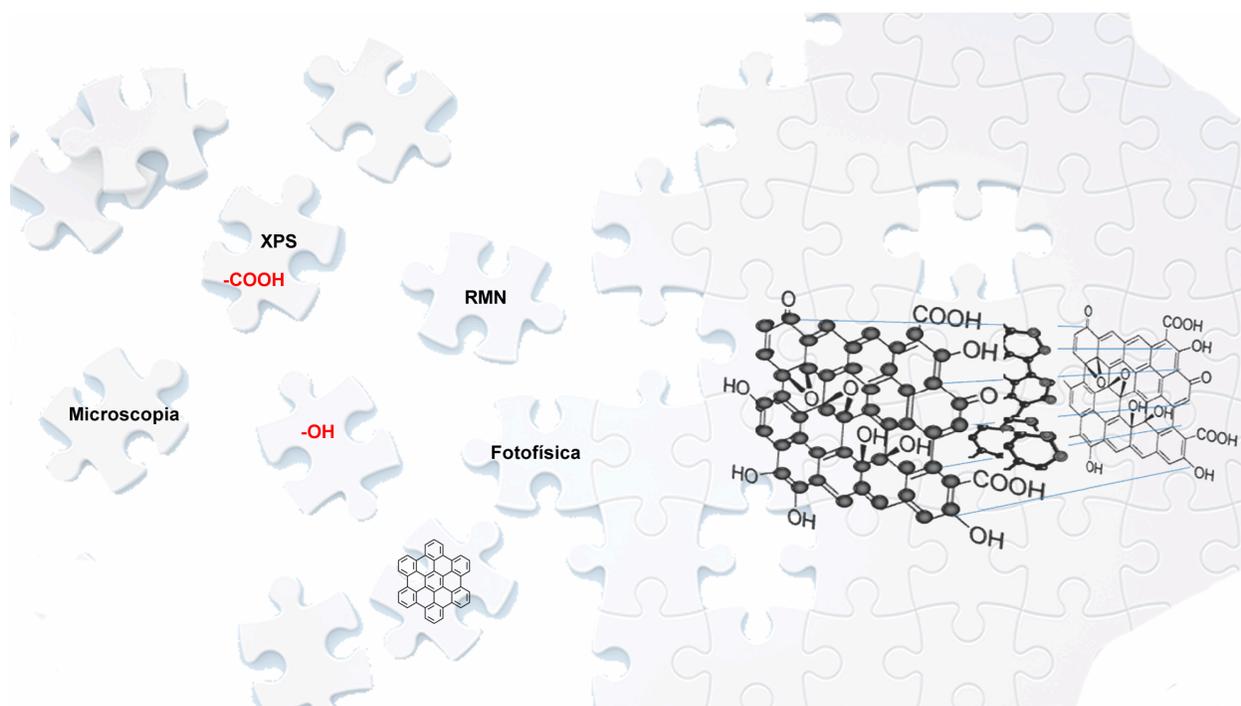


Figura 30. Estrutura genérica proposta para os *Carbon Dots*.

4.2 Titulação

Considerando as informações obtidas no processo de caracterização, pode-se observar a existência de grupos fenolatos e carboxilatos na superfície das nanopartículas. Para determinar as constantes de dissociação destes grupos, experimentos de titulação foram realizados (Figura 31).^{161,184}

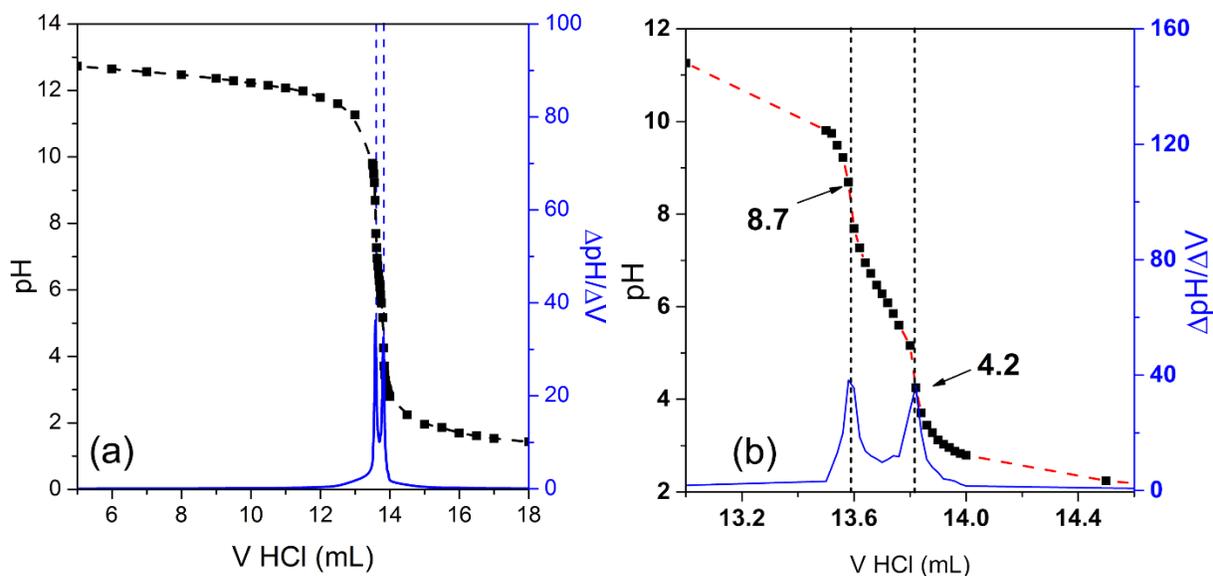


Figura 31. Curva de titulação dos *Carbon Dots* (preto) e sua derivada (azul) (a). Expansão da curva de titulação indicando os pontos de inflexão obtidos por meio da primeira derivada.

Dois pontos de inflexão podem ser observados na curva de titulação, indicando a existência de duas constantes de dissociação, corroborando com as informações obtidas durante as análises realizadas no processo de caracterização. Uma constante é referente aos grupos de ácidos carboxílicos, $pK_a = 4,3$, e a outra aos grupos fenólicos, $pK_a = 8,7$ (Figura 32).

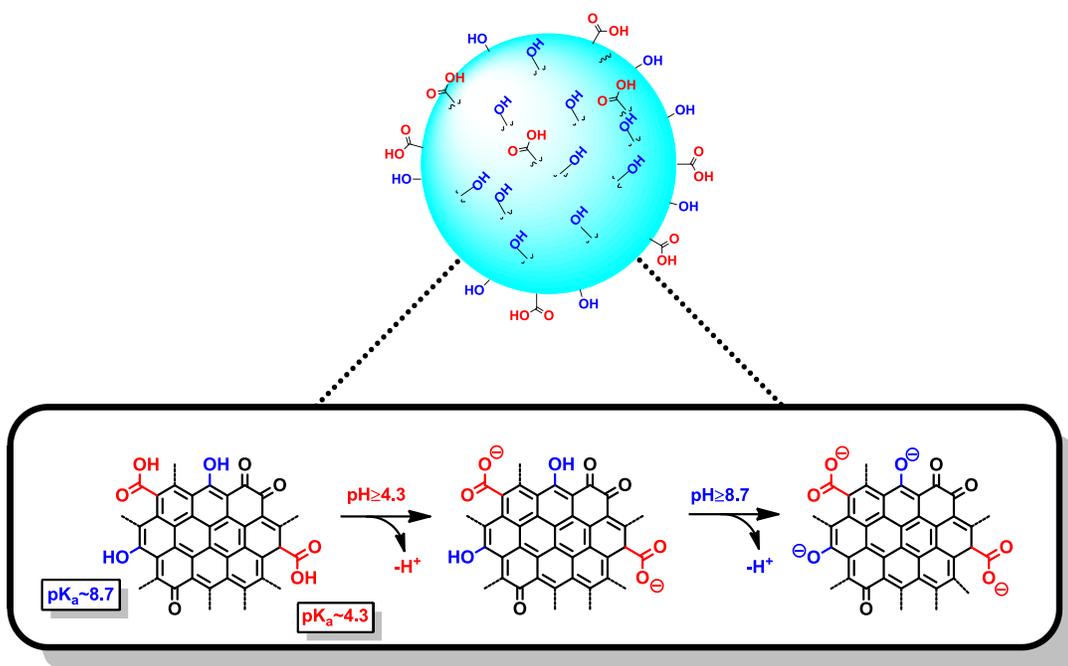


Figura 32. Proposta de sequência de ionização para os *Carbon Dots* em diferentes valores de pH de acordo com os valores de pKa obtidos.

Sabendo da existência destes grupos na superfície do material, considerou-se a possibilidade de estas partículas poderem interagir com o solvente em que se encontram solubilizadas e também entre si por meio de ligações de hidrogênio. A possibilidade da existência deste tipo de interação entre as partículas foi explorada e os resultados serão apresentados em seções posteriores no decorrer do texto. Uma vez que fosse comprovada a ocorrência das ligações de hidrogênio, a formação de agregados em solução seria uma nova possibilidade a ser explorada.

Então, tendo como base a presença dos grupos capazes de formar ligações de hidrogênio e os dois pontos de inflexão na curva de titulação, as propriedades fotofísicas dos *Carbon Dots* foram investigadas em diferentes condições de pH e em diferentes solventes. Os dados são apresentados nas próximas seções. Um resultado interessante destes estudos foi observar que as partículas obtidas neste trabalho se comportam de maneira diferente em relação às outras nanopartículas de carbono relatadas na literatura.^{185,186}

4.3 Propriedades Fotoluminescentes

Os *Carbon Dots* sintetizados neste trabalho apresentam propriedades fotoluminescentes similares a aquelas descritas na literatura, tais como absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência dependente do comprimento de onda de excitação. A origem da fotoluminescência dos *Carbon Dots* é tema de amplo debate na literatura,^{108,187} uma das vertentes defende que a fotoluminescência acontece devido à recombinação dos pares elétron/buracos existentes nas ilhas de carbono sp^2 , a outra sugere que a luz observada nesses materiais se origina devido à presença de pequenas moléculas fluorescentes, como o xileno, formadas juntamente com as partículas maiores.^{108,188}

A Figura 33 apresenta o estudo fotofísico das nanopartículas. O espectro de absorção (Figura 33a), medido numa solução aquosa de pH = 5, apresenta três bandas de absorção, centradas em 227 nm, 293 nm e 358 nm (Figura 33a).

A absorção localizada entre 300-400 nm, normalmente é atribuída a transições eletrônicas do tipo $n-\pi^*$,^{189,190} que se originariam devido à presença dos grupos funcionais ricos em oxigênio presentes na superfície das partículas. Entretanto, considerando as intensidades das absorções, acredita-se que todas as transições observadas no espectro sejam do tipo $\pi-\pi^*$, e seus valores mudam de posição de acordo com o tamanho da rede de carbonos poliaromáticos conjugados.

A segunda absorção, localizada entre 300-400 nm, é atribuída também a transições aromáticas $\pi-\pi^*$,¹⁶⁴ relacionadas a transições da parte central da rede de carbonos aromáticos. A transição localizada em 227 nm é pouco discutida na literatura e suas origens ainda são tema de debate entre os pesquisadores.¹³⁰ Absorções nesta região são atribuídas às transições $\pi-\pi^*$, mas de grupos isolados e pouco conjugados como olefinas e anéis aromáticos não condensados.¹⁹¹ A emissão de fluorescência dessas bandas de absorção (Figura S18) são muito similares umas às outras, resultado este que corrobora com a proposta de todas as transições serem do tipo “*spin allowed*”.

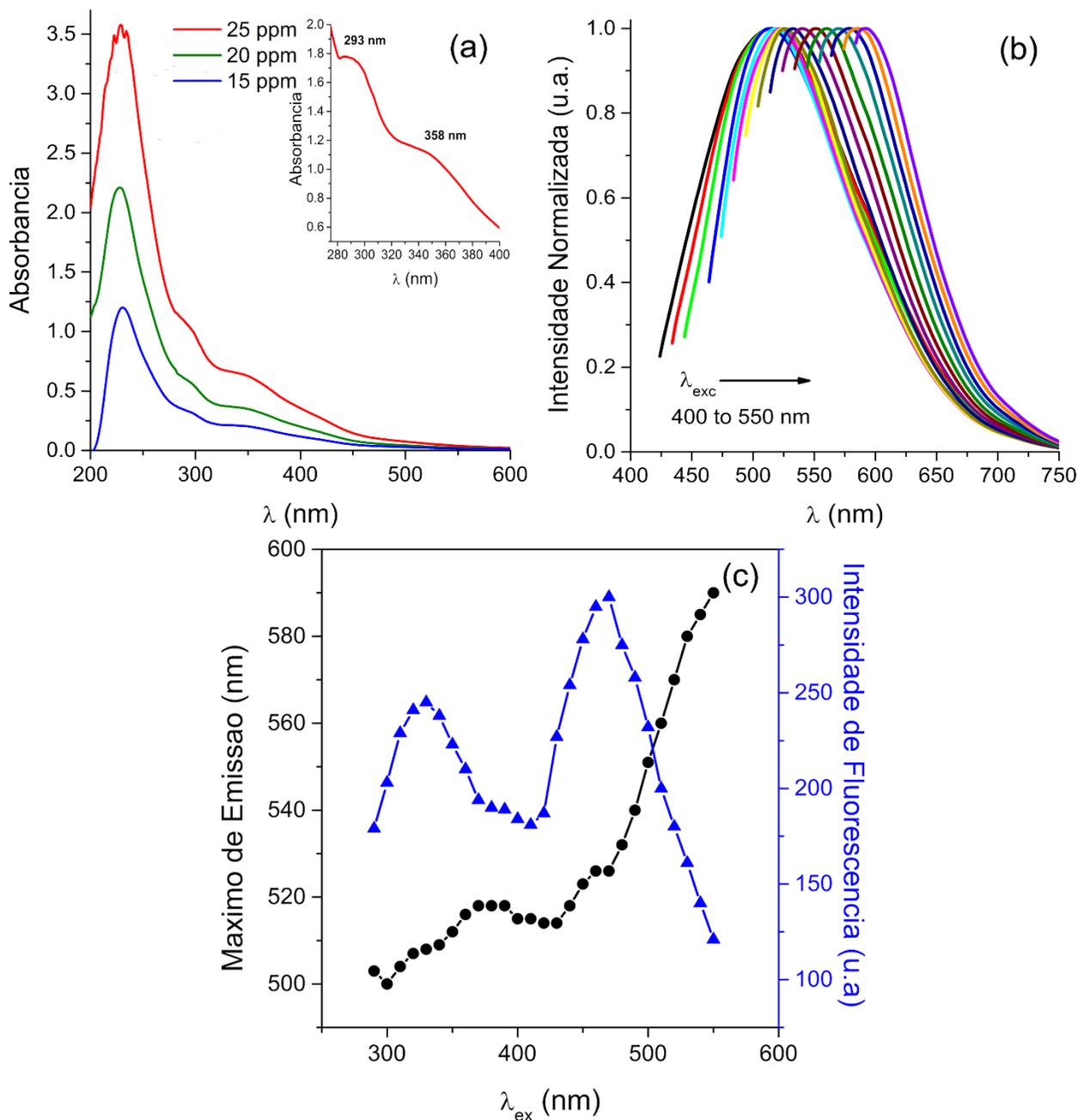


Figura 33. (a) Espectro de UV-Vis dos *Carbon Dots* em solução aquosa em diferentes concentrações (15-25 ppm). O *inset* apresenta a ampliação da região de 280-400 nm na concentração de 25 ppm. (b) Emissão de fluorescência normalizada em diferentes comprimentos de onda de excitação, 400-550 nm. (c) Gráfico da excitação (λ_{ex}) vs. máximo de emissão (λ_{em}) (preto) e intensidade de fluorescência (azul).

O comprimento de onda de emissão dos *Carbon Dots* varia com o de excitação (Figura 33b), na faixa de 280-560 nm, apesar dessa variação, uma relação não linear é observada entre as duas variáveis (Figura 33c). Excitação de 300 nm a 370 nm apresenta uma relação linear. De 330 nm a 430 nm, o λ máximo de emissão permanece praticamente o mesmo, com apenas pequenas variações. Ao se excitar os *Carbon Dots* com λ a partir de 430 nm, o máximo de emissão varia enormemente até 550 nm. A partir desses valores de excitação, a intensidade de emissão diminui significativamente (Figura 33c (azul)). Esta dependência, entre emissão e a excitação, que parece violar a lei de Kasha, pode ser explicada pela presença dos múltiplos estados eletrônicos provenientes dos aglomerados e das folhas grafênicas de diferentes tamanhos.

4.3.1 Efeito do pH

Uma variável que influencia bastante nas propriedades fotoluminescentes dos *Carbon Dots* é o pH da solução em que se encontram. Como vimos anteriormente, estas partículas possuem grupos fenólicos e carboxílicos em sua superfície. Dependendo da acidez do meio em que se encontram, estes grupos podem estar protonados ou não, e esta condição tem grandes consequências sobre o sinal luminoso. Para melhor compreender como esse processo de protonação e desprotonação interfere nas propriedades de sua luminescência, estes materiais tiveram suas propriedades fotofísicas investigadas em diferentes condições de pH.

Primeiro foi realizado um experimento de titulação para que as constantes de acidez dos grupos presentes na superfície fossem obtidas. Em seguida, foram medidos os espectros de absorção e emissão variando-se o pH de 1 a 13.

Analisando-se o espectro de UV-Vis dos *Carbon Dots* em diferentes pHs, notam-se sutis mudanças no perfil da banda de absorção (Figura 34a). Ao se comparar a absorção em pH = 1 com a banda de absorção em pHs menos ácidos (5, 6), observa-se que em pH ácido a absorvidade é menor e que também a banda de absorção presente em 350 nm não está presente e a absorção em 298 nm é muito mais intensa. Em meio básico, pH = 13, parece haver um deslocamento nas bandas de absorção e também um aumento na absorvidade.

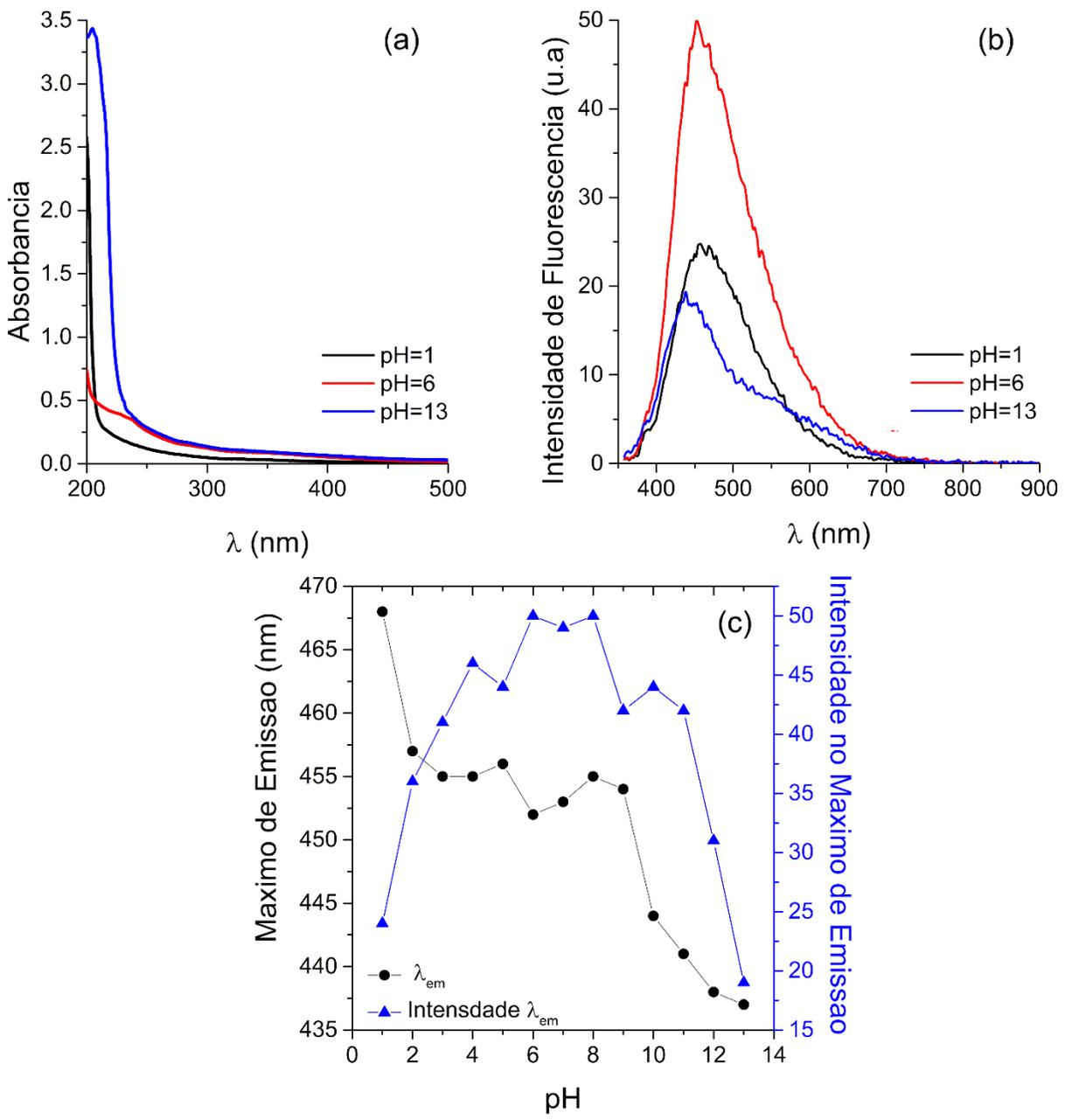


Figura 34. Absorbância (a) e Intensidade de Fluorescência (b) em diferentes condições de pH. (b) Gráfico do pH vs. posição do máximo de emissão (λ_{em}) (preto) e Intensidade de Fluorescência (azul). Espectros medidos com excitação em 340 nm.

Em pH 1 (Figura 34b), uma banda com máximo de emissão em 470 nm é observada. Ao se aumentar para pH 6, pode se notar um aumento na intensidade de emissão com um pequeno deslocamento na posição do máximo (455 nm). Em pH 13, uma banda de emissão dupla passa a ser observada. O máximo de emissão permanece inalterado (~450 nm), porém uma banda adicional e menos intensa, deslocada para o vermelho surge em 550 nm. Este resultado contrasta com outros estudos que relatam apenas um deslocamento batocrômico para essas condições de pH.¹⁹²

Com base na posição da banda de emissão máxima para os meios ácido e neutro (pH 2 a 8), pode se concluir que a porção conjugada responsável pela fluorescência nos *Carbon Dots* é a mesma. Desta maneira, acredita-se que em meio ácido, os grupos funcionais que contêm oxigênio estão completamente protonados (Figura 32), induzindo a uma interação diferente entre as nanopartículas, favorecendo os decaimentos não radiativos. Além do mais, com os pares de elétrons dos grupos funcionais protonados, a interação entre as partículas torna-se limitada, uma vez que a formação de ligações de hidrogênio torna-se dificultada, impedindo a interação entre elas.

Na faixa de pH = 6 a pH = 8, a intensidade de fluorescência atinge seu máximo (Figura 34c). Nesta faixa de pH, os grupos fenólicos e carboxílicos não estão ionizados.¹⁹³

Com o aumento da alcalinidade, pH acima de 9, os grupos fenólicos e carboxílicos são desprotonados, aumentando a repulsão entre as partículas que agora estão negativamente carregadas. Em meio básico, as propriedades fotofísicas são diferentes daquelas formadas em meio ácido. Além da banda de emissão principal, 470 nm, observada tanto em meio ácido quanto em meio neutro, em meio básico as partículas apresentam uma nova banda de emissão centrada em 550 nm (Figura 34b). Esta banda, provavelmente originou-se devido aos processos de transferência de cargas.

Levando em consideração os resultados obtidos nas análises de variação de pH, conclui-se que estas nanopartículas podem formar agregados em solução e isto é ainda um fenômeno pouco investigado na literatura. Um dos primeiros experimentos realizados para explorar essa possibilidade foi analisar a posição da banda do máximo de absorção e emissão em diferentes concentrações. Os espectros apresentados na Figura 35a

mostram que não há deslocamento das bandas de absorção ao se variar a concentração. No entanto, o comportamento das bandas de emissão é diferente (Figura 35). De acordo com a hipótese formulada, se houvesse a formação de agregados em solução, a posição das bandas deveria mudar de acordo com a concentração, devido a fenômenos de transferência de carga que ocorrem de acordo com a proximidade das partículas em solução.^{72,194} E para nossa surpresa, este efeito foi observado ao se analisar as bandas de emissão em diferentes concentrações.

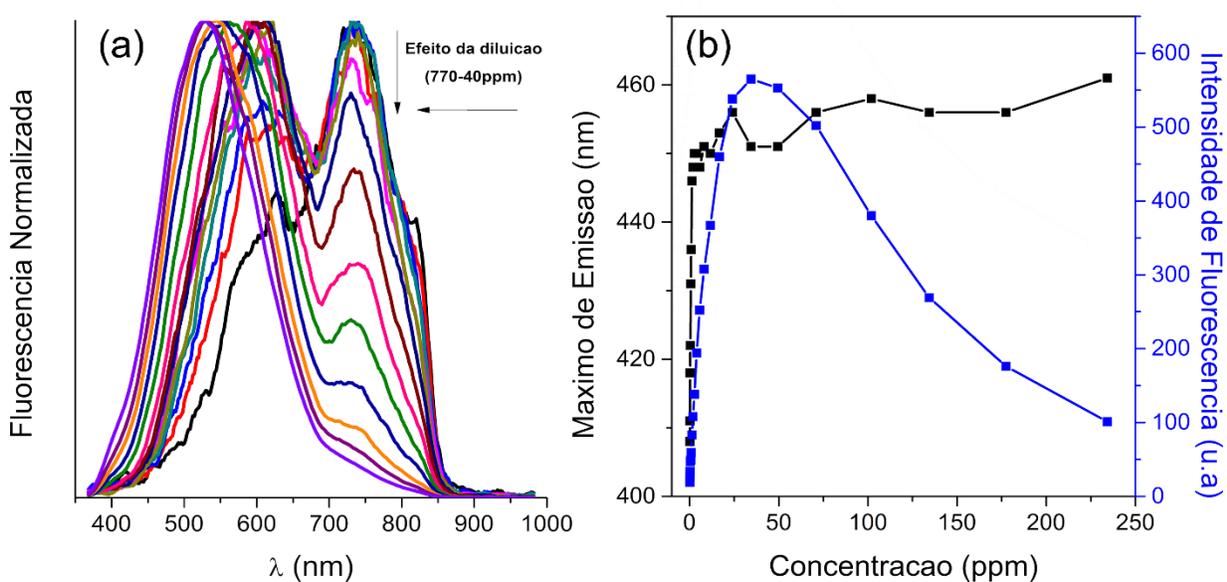


Figura 35. (a) Espectros de emissão normalizados dos *Carbon Dots* em diferentes concentrações [770 ppm a 40 ppm]. (b) Gráfico da concentração (ppm) vs. posição do máximo de emissão (preto) e intensidade de fluorescência (azul). A intensidade foi medida no máximo de emissão de cada curva. Os espectros foram obtidos com excitação em 300 nm.

Os resultados mostram que a emissão destas partículas é significativamente dependente de sua concentração. A solução mais concentrada (~770 ppm) apresenta banda de emissão dupla na região do IV próximo, uma localizada em 750 nm e a outra deslocada para o azul, em 600 nm. Ao se diminuir a concentração, a intensidade da

banda centrada em 770 nm diminui, enquanto a intensidade da banda em 600 nm aumenta. A partir de aproximadamente 400 ppm, a banda localizada em 600 nm passa a ter um deslocamento hipsocrômico (600 nm para 500 nm).

Ainda não está claro se a baixa intensidade de emissão dos *Carbon Dots* em soluções mais concentradas é causada por efeitos de filtro interno (IFE = *inner filter effect*)^{195,196} ou por outros mecanismos de supressão causados por processos de transferência de energia.^{105,145,191} Em concentrações maiores, acredita-se que agregados sejam formados e a formação destes influencie nas propriedades do estado excitado e, conseqüentemente, na fotoluminescência destes materiais.

Emissões na região do IV próximo não são comuns para materiais não dopados derivados de carbono.¹⁰⁸ Nos materiais dopados normalmente são reportados emissões por volta de 600 nm por causa de modificações em suas estruturas.¹⁴⁵ A emissão observada nesta região para as partículas obtidas neste trabalho pode estar relacionada à formação dos agregados em solução. A agregação destas partículas¹⁵⁸ é facilitada devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogênio¹⁴⁵ e às interações π -*stacking*^{105,145,164,190,191} que podem ocorrer devido à presença de domínios de carbonos aromáticos policíclicos.

A formação destas partículas maiores favorece decaimentos radiativos em energias menores. Estes resultados mostram que as nanopartículas podem interagir e formar agregados em solução mesmo em concentrações muito diminutas, assim como já foi observado para outros materiais.¹⁵⁷ Além da posição do máximo de emissão, a intensidade da fluorescência também é diretamente afetada pela concentração. Atinge o seu máximo na concentração de 35 ppm (Figura 35b). Em concentrações acima deste ponto, os mecanismos de supressão diminuem a intensidade do sinal luminoso.

4.3.2 Fluorescência resolvida no tempo

Medidas de fluorescência resolvida no tempo também foram utilizadas afim de melhor compreender as propriedades deste material. Os dados são apresentados na **Tabela 5** e na Figura 36. Os espectros dos tempos de decaimento de todas as amostras estudadas foram fitadas com decaimentos de exponencial dupla com bons valores de χ^2 . De maneira geral, todas as amostras apresentaram dois tempos de decaimento, um tempo de vida menor que 1 ns e um mais longo, variando de 1,6 a ~ 5 ns, de acordo com as condições da análise. As soluções mais concentradas (80 ppm) apresentaram tempos de vida e percentual populacional próximos daquela observada para a amostra realizada em concentrações de 16 ppm. Por outro lado, na solução mais diluída (3 ppm), mudanças significativas foram observadas. Dois tempos de decaimento ainda podem ser observados, sendo que o mais curto (0,071 ns) é predominante (Tabela 5, entrada 3).

Ao se realizar as análises em diferentes pHs, interessantes efeitos são observados. O tempo de decaimento dos C-dots em soluções de pHs extremos indica que as partículas, nestas condições, comportam-se de maneira semelhante ao comportamento em soluções diluídas. Isso ocorre, provavelmente, devido à repulsão entre as partículas. Em meio ácido (pH 1) e básico (pH 13), a 16 ppm, a duração dos tempos de decaimento mais curtos é semelhante. A duração dos tempos de vida mais longos também é semelhante (~ 2ns). Com base nos resultados das seções anteriores e nos tempos de decaimento, acredita-se que os tempos de decaimento mais curtos sejam provenientes das partículas menores presentes nas soluções.

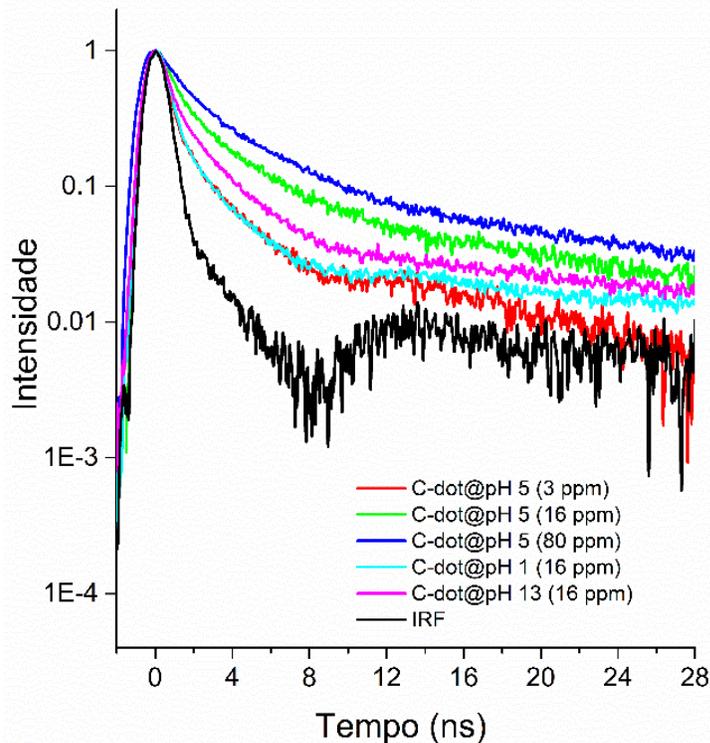


Figura 36. Espectro de emissão de fluorescência resolvida no tempo dos C-dots em diferentes soluções. IRF = *Instrument Response Function*.

Tabela 5. Dados relevantes de Fluorescência Resolvida no Tempo para os C-dots em diferentes condições de pH e concentração, em que τ é o tempo de vida da fluorescência (em ns) e τ_{av} é a média dos tempos de vida. Os números 1 e 2 são relativos aos diferentes decaimentos observados.

	Amostra	Conc.	pH	τ_1 (%)	τ_2 (%)	τ_{av}
1	C-dot	16	5	0.667 (78.96)	4.494 (21.04)	1.472
2	Concentrada	80	5	0.821 (70.37)	4.806 (29.63)	2.002
3	Diluída	3	5	0.071 (98.13)	1.941 (1.87)	0.106
4	Meio ácido	16	1	0.035 (98.78)	1.641 (1.22)	0.055
5	Meio básico	16	13	0.066 (96.64)	2.013 (3.36)	0.131

4.4 Estudo de agregação

Os dados obtidos na seção anterior corroboram com a hipótese de que as nanopartículas podem interagir entre si em solução. Ao interagirem, levam à formação de agregados, de diversos tamanhos, que podem sofrer processos de troca de energia no estado excitado o que tem consequências diretas em suas propriedades fotofísicas.¹⁹⁷ Afim de investigar mais a fundo como estas partículas interagem em diferentes condições de concentração e pH, foram realizadas análises de raio hidrodinâmico e de potencial zeta (ζ).

Considerando os resultados obtidos por meio dos experimentos de DLS (Figura 37, em azul ▲), observa-se que em valores de pH mais ácido ou mais básico, o raio hidrodinâmico das partículas flutua entre 100 nm e 200 nm. Com base nestes dados e nos tamanhos medidos nas imagens de TEM, pode-se dizer que as soluções dos *Carbon Dots* devem ser coloidais.

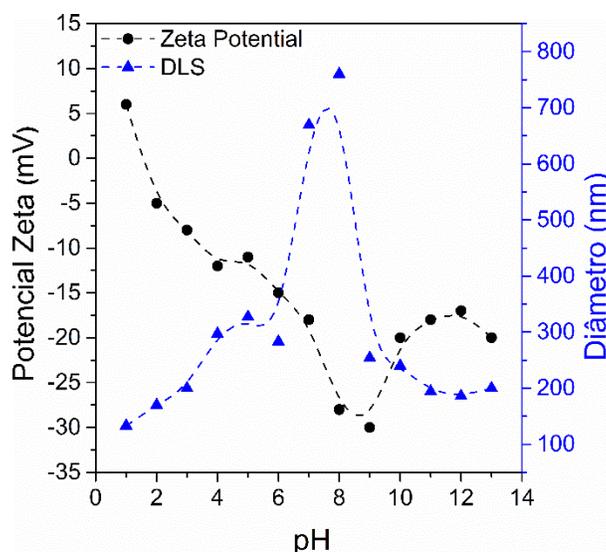


Figura 37. Análises de DLS (linha azul ▲) e de potencial Zeta (linha preta ●) dos *Carbon Dots* em função do pH. Todas as análises foram realizadas na concentração de 16 ppm.

Na Figura 38 é apresentada uma proposta da agregação das partículas de acordo com o pH da solução. As partículas existentes em meio ácido e básico são menores do

que aquelas existentes na faixa de pH neutro. Este processo é consequência da repulsão Coulombiana das espécies positivas observadas em meio ácido e das espécies negativas observadas em meio básico. Em meio neutro, a agregação é favorecida, pois não há repulsão coulombiana entre as partículas e os grupos funcionais oxigenados estão livres para interagirem entre si e formarem ligações de hidrogênio.^{55,80-82}

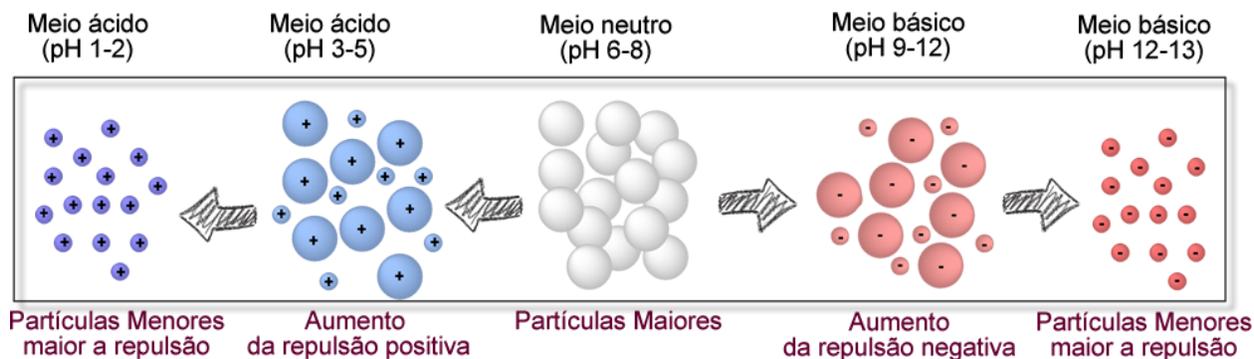


Figura 38. Proposta de dinâmica de agregação para os *Carbon Dots* em diferentes condições de pH.

O potencial zeta fornece informações a respeito da carga de superfície e é também uma propriedade importante no que se refere à medida de estabilidade das partículas em solução. Usualmente, partículas com valores de potencial zeta maior do que + 30 mV ou menores do que - 30 mV são consideradas estáveis devido à repulsão eletrostática.¹⁹⁸ Os dados apresentados na Figura 37 (linha preta ●) mostram que o potencial zeta das partículas é dependente do pH. O gráfico indica que os *Carbon Dots* nesta concentração são instáveis em solução, pois os valores ζ são na maior parte abaixo, em módulo, de - 30 mV.^{198,199} Os valores mostram que mesmo em pH neutro, faixa de maior agregação, a solução não pode ser considerada estável. Apesar disso, os dados obtidos são coerentes com o esperado e similares a dados relatados na literatura.¹⁶¹ Em meio ácido, os valores de zeta são positivos ou menos negativos. Isso ocorre, pois em pH = 1 os grupos funcionais estão protonados, conferindo carga positiva à superfície das partículas. No entanto, apesar de ainda em meio ácido, em valores de

pH maior do que 1, os valores de zeta passam a ser negativos. Em pH 2, zeta = - 5 mV, menos grupos estão protonados e o caráter negativo das partículas pode ser explicado devido à nuvem de elétrons π presentes nos domínios de carbono sp^2 . O valor de zeta cresce até pH 9, em que é obtido o valor mais extremo, -35 mV. O aumento observado no potencial ζ em pHs maiores ocorre devido à compressão da camada dupla em soluções de maior força iônica.^{199,200}

Estes dados são, portanto, coerentes com as conclusões obtidas na seção anterior e com a proposta de agregação apresentada na Figura 38.

As análises de espalhamento de luz DLS (*Dynamic Light Scattering*) foram realizadas em soluções de pH 5,5 com diferentes concentrações das nanopartículas (Figura 39). As medidas foram realizadas nestas condições, pois é nesta faixa de pH em que a formação dos agregados é mais favorecida. Nela os grupos oxigenados estão livres para interagirem por meio das ligações de hidrogênio, como pode ser observado na Figura 32 e nos dados do potencial zeta.^{199,201,202}

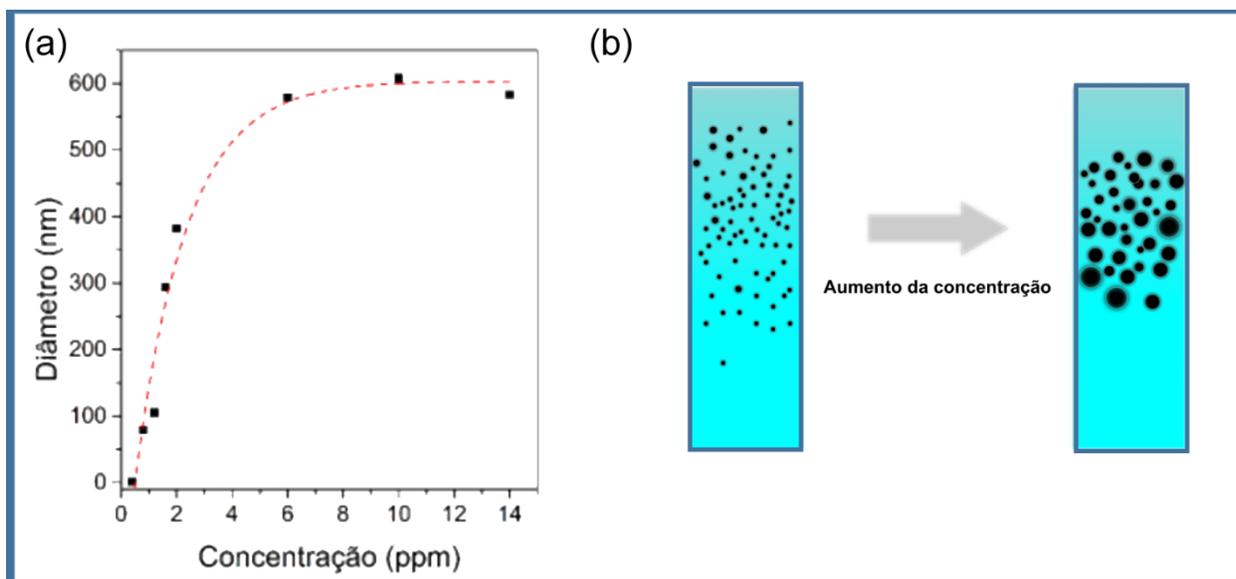


Figura 39. Raio hidrodinâmico dos *Carbon Dots* em solução aquosa (pH 5,5) em diferentes concentrações (a). Representação esquemática da distribuição das partículas em solução dependendo da concentração (b).

4.4.1 Ligações de Hidrogênio

Na seção anterior vimos que a emissão dos C-dots é dependente do comprimento de onda de excitação. Existem inúmeros trabalhos na literatura dedicados a explorar a origem dessa dependência,^{11,108,130} em que fatores ligados à estrutura das nanopartículas, como métodos de síntese, material de partida utilizado e grau de oxidação são determinantes em suas propriedades fotofísicas. Apesar do grande número de trabalhos, os resultados e conclusões dos diferentes grupos de pesquisa são contraditórios e os mecanismos emissivos destes materiais permanecem ainda não elucidados.

As propriedades fotoluminescentes dessas nanopartículas também são dependentes de fatores externos, como pH¹⁹² e solvente.²⁰³ Devido à presença dos grupos carboxílicos, hidroxilas e carbonilas, essas nanopartículas são capazes de realizar interações com os solventes que tem efeitos determinantes em suas propriedades de emissão. Desta forma, a solvatação pode ser utilizada como uma ferramenta na investigação das propriedades fotofísicas deste material. No entanto, apesar da enorme quantidade de trabalhos que tratam sobre fotoluminescência dos C-dots, é impressionante como poucos grupos de pesquisa exploraram esta estratégia. Poucos são os trabalhos que discutem sua luminescência em meio não aquoso e mais escassos ainda são os que discutem o efeito do solvatocromismo.

Se o estado da superfície dos C-dots está envolvido nos mecanismos de emissão, a compreensão das interações partícula-solvente é essencial na determinação de suas propriedades.

A dispersão dos C-dots no meio depende do momento de dipolo do solvente. Em meios polares, as dispersões tendem a ser mais estáveis devido à formação de ligações de hidrogênio com as moléculas do solvente.²⁰⁴ Além de favorecerem uma dispersão mais estável, as ligações de hidrogênio também afetam significativamente os processos de transferência de carga no estado excitado.^{72,205}

Na Figura 40 é possível observar os espectros de fluorescência dos C-dots em diferentes solventes. Em acetona, MeCN, água, metanol e DMSO é possível observar

duas bandas de emissão (destacadas em azul claro e cinza). Em hexano e tolueno, é observado apenas a banda com menor λ de emissão e com intensidade muito menor.

Estes espectros mostram a complexidade do sistema dos C-dots e como suas soluções são heterogêneas. Em solventes apolares é observada apenas uma banda de emissão e atribui-se que essa emissão pouco intensa seja originada de partículas menores e com menor grau de oxidação. As partículas com maior grau de oxidação não solubilizam ou não são formadas nesse ambiente e, por isso, sua emissão não é observada.

Em solventes polares, ambas as emissões são observadas e, dependendo do momento de dipolo e sua capacidade de realizar ligações de hidrogênio com os analitos, as emissões podem variar de intensidade. DMSO é o solvente com maior momento de dipolo (Tabela 6) e que possui maior intensidade de fluorescência. Hexano, com o menor momento dipolo dentre os solventes testados, apresenta comportamento contrário, com a menor intensidade observada quando comparado aos demais.

Estes resultados são importantes, pois demonstram a influência que as ligações de hidrogênio tem na dispersão e estabilização dos agregados e no estado excitado destas partículas.

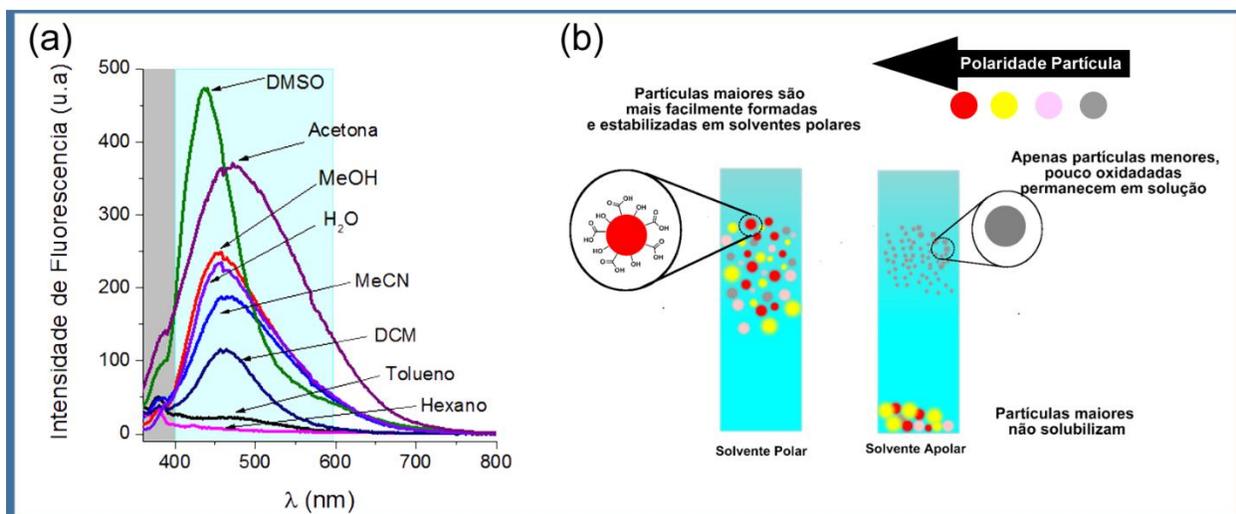


Figura 40. Espectro de fluorescência dos C-dots em diferentes solventes a 16 ppm, com excitação em 300 nm (a). Representação esquemática da distribuição das partículas em solução dependendo do tipo de solvente (b).

Tabela 6. Dados fotofísicos dos C-dots em diferentes solventes

	Solvente	Momento de dipolo	Constante Dielétrica	E_T^N	$\lambda_{\max}(\text{em})(\text{nm})$	Intensidade
C-dot	DCM	1,14	8,93	0,309	464	115
	DMSO	4,1	46,68	0,444	436	473
	MeCN	3,44	37,5	0,460	472	188
	MeOH	2,87	32,70	0,762	458	248
	Tolueno	0,31	2,38	0,099	704	22
	Água	1,87	80,1	1,000	458	234
	Acetona	2,69	20,7	0,355	471	370
	Hexano	0,08	1,88	0,009	-	-

4.5 Estudo com Íons Metálicos

Uma característica interessante dos materiais obtidos, além da emissão no amarelo, é o tamanho das partículas. Na literatura, os relatos mostram partículas com tamanhos menores do que 10 nm. Mesmo depois de centrifugar o material a 13000 rpm por 45 minutos, não foi possível isolar unicamente as partículas menores. Um método de ultracentrifugação utilizando álcool e éter etílico como co-solventes^{113,206} também foi testados no entanto não foi possível fazer com que as partículas de diâmetro maior precipitassem. Isto provavelmente ocorre devido à repulsão eletrostática entre as partículas carregadas negativamente na solução, o que impede a sua precipitação, ver Figura 38.²⁰⁷ Devido à carga negativa na superfície, a adição de uma série de íons positivos nas soluções contendo os C-dots seria uma maneira de diminuir a repulsão entre as partículas e fazer com que precipitassem.

Este fato combinado com a capacidade elétron doadora dos C-dots possui um enorme potencial para a síntese de nanopartículas metálicas utilizando os *Carbons dots* como centros de aglutinação. Já são reportados na literatura estudos relatando o crescimento de nanopartículas na superfície dos C-dots por vias térmicas e luminosas.^{208,209} A maior parte dos trabalhos utilizam prata e ouro em suas investigações, enquanto que estudos utilizando outros metais são mais escassos, no entanto também podem ser encontrados.²¹⁰

Desta maneira, primeiro foi adicionada uma solução 0,2 M de Ag^+ a uma solução 16 ppm de C-dots. Instantaneamente, foi observado que a solução coalesce devido a interação dos íons de prata e dos C-dots. O processo de coalescência foi verificado por meio da ocorrência do efeito Tyndall (**Figura 41**).^{99,211,212} Esse comportamento é característico de sistemas coloidais²¹³ estabilizados por meio de repulsão eletrostática.²¹²

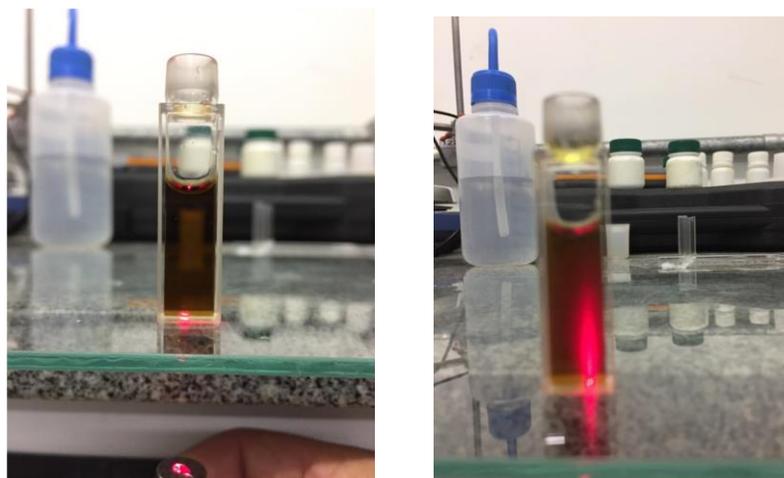


Figura 41. (a) Não ocorrência do efeito Tyndall em soluções contendo apenas C-dots. (b) Demonstração da ocorrência do efeito Tyndall em soluções de C-dots na presença de íons metálicos.

Estudos da interação dos C-dots com íons de prata são mais comuns na literatura,²⁰⁸ além destes íons serem facilmente reduzidos, resolveu-se testar o comportamento das partículas na presença de outros tipos de cátions. Primeiro, soluções 0,2 M de LiCl, NaCl e KCl foram adicionadas a soluções 1 mg mL^{-1} dos C-dots. Após 5 minutos as soluções foram centrifugadas e a presença de material precipitado foi observada em todas elas, indicando que íons com potencial de redução mais elevado também podem interagir com as partículas. Cátions não metálicos como líquidos iônicos e sais de amônio também foram testados e resultados similares foram obtidos, suportando ainda mais a hipótese de diminuição de repulsão entre as partículas quando

na presença de íons positivos. A superfície carregada negativamente atrai os íons de carga positiva e os grupos carboxilatos e fenolatos agem como sítios de ancoragem para os cátions metálicos.

Para melhor compreender a interação dos C-dots com os cátions, estudos fotofísicos utilizando espectroscopia de absorção no UV-Vis, emissão de fluorescência e fluorescência resolvida no tempo foram conduzidos na presença dos íons positivos.

Nesta seção, foi testada uma série de cátions metálicos: Al^{3+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Cs^+ , Li^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Os^{3+} , Au^+ , In^{3+} , Ag^+ , Ru^{3+} , Pd^{2+} , Zr^{4+} , Fe^{3+} e Ce^{3+} . A influência destes íons na fotoluminescência dos C-dots pode ser visualizada na Figura 42.

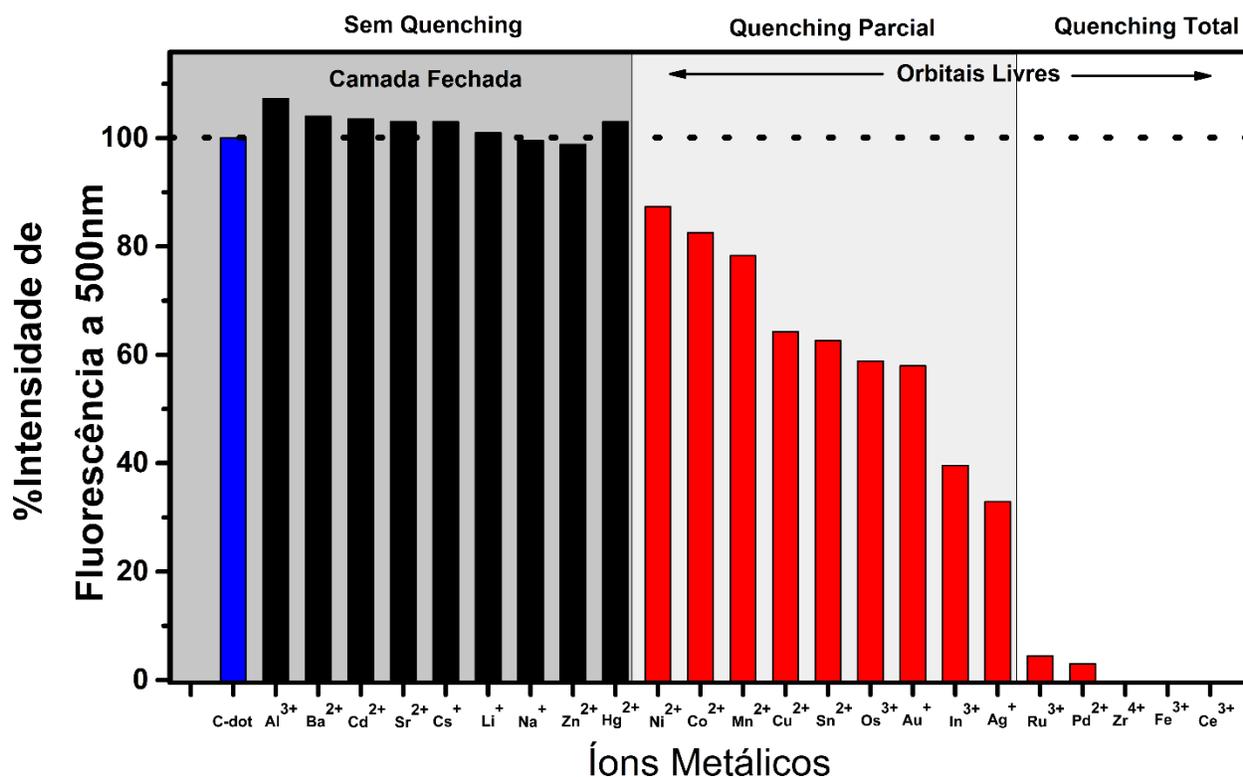


Figura 42. Intensidade de fluorescência dos C-dots em 500 nm em soluções com 160 μM dos íons metálicos em água deionizada. Excitações foram realizadas em 300 nm.

Os espectros de absorção dos *Carbon Dots* na presença e na ausência dos íons foram medidos e podem ser vistos na Figura S19. De maneira geral, foi observado que

os espectros não foram significativamente alterados quando na presença da maioria dos cátions metálicos. Entretanto, após a adição de Ag^+ , Fe^{3+} e Ru^{3+} um efeito hiper-crômico ocorre nas bandas de absorção das nanopartículas (Figura 43). Este aumento na absorção das bandas não ocorre devido à absorção do próprio íon, mas sim em função da interação dos C-dots com os metais. Esta interação leva à formação de complexos no estado fundamental que absorvem luz de maneira mais eficiente,²¹⁴ como já foi reportado para outros casos.²¹⁵⁻²¹⁷

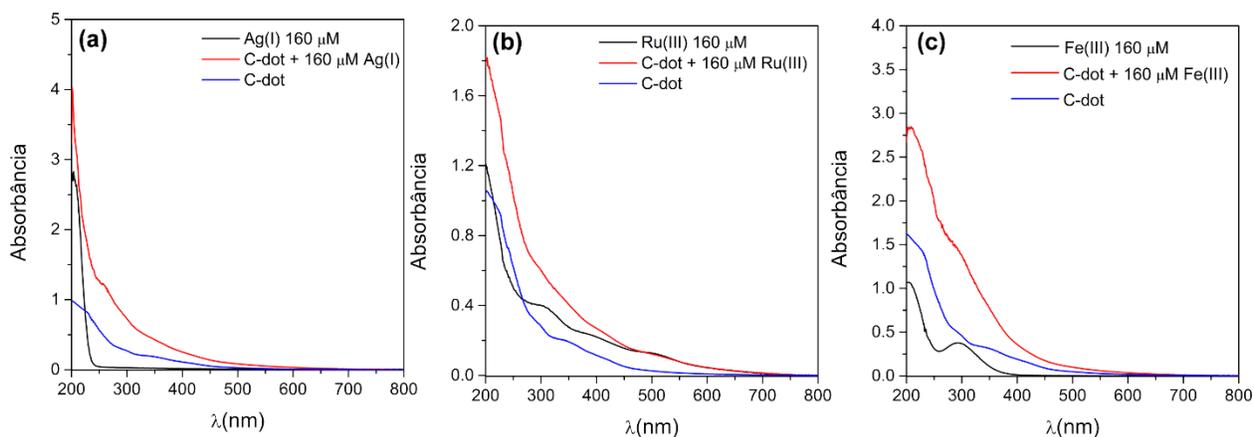


Figura 43. Espectros de absorção dos íons metálicos (preto), dos C-dots (16 ppm) (azul), e dos C-dots na presença dos íons (vermelho).

A absorção mais eficiente de luz pode ser atribuída às partículas *core-shell* maiores²¹⁷ formadas após a adição dos íons metálicos. Esperava-se que tais partículas deslocassem a posição das bandas de absorção, no entanto este efeito não foi observado. Ao invés da formação de partículas maiores, outra possível explicação para o resultado observado pode ser a formação de partículas menores. Logo depois da adição dos íons (Ag^+ , Fe^{3+} e Ru^{3+}), as partículas maiores presentes na solução podem ser desagregadas, e após este processo a área das partículas disponível para absorção aumenta e consequentemente a sua absorvidade (Figura 44). ††

†† Efeito semelhante ocorre no desmembramento do DNA. Um processo em que a dupla hélice é desmembrada e as bases aromáticas são desalinhasadas e assim a luz é absorvida de maneira mais eficiente.

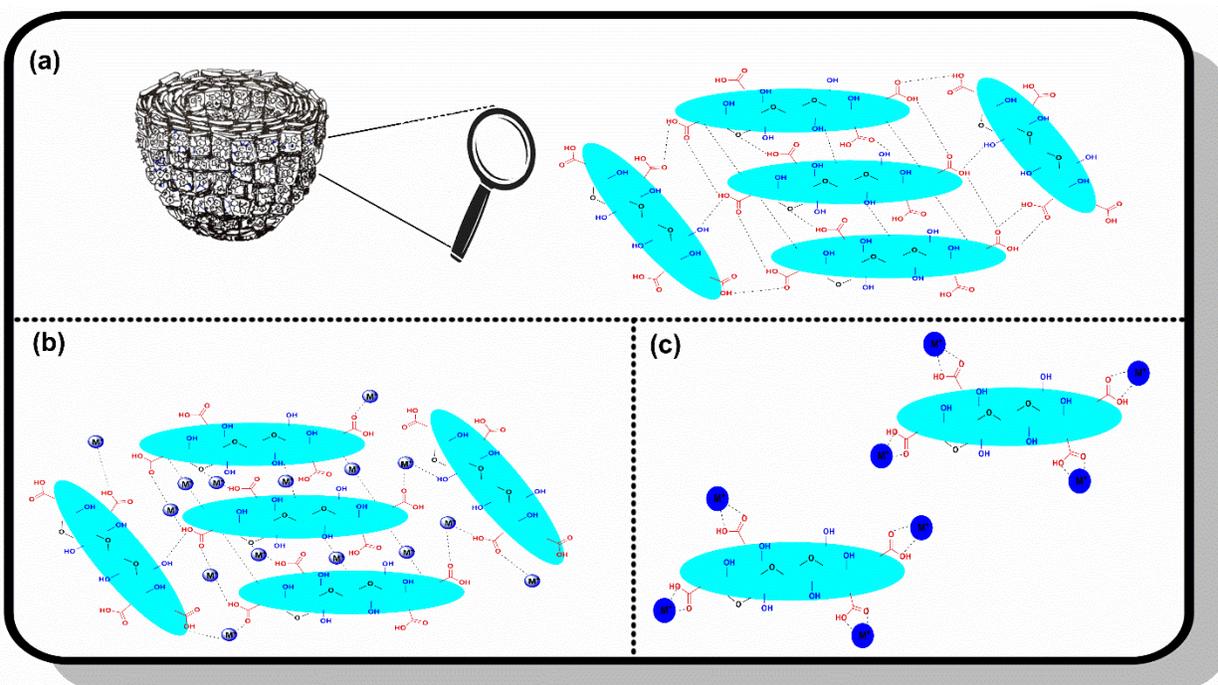


Figura 44. Proposta de interação dos C-dots com os íons metálicos. (a) C-dots agregados. (b) Interação inicial dos C-dots com os íons. (c) Desagregação causada pela interação com os íons.

Na Figura 45 é apresentada a variação da intensidade de fluorescência na presença dos íons. Estes foram classificados levando em consideração o efeito que exerceram no comportamento fotofísico das nanopartículas. Foi observado que alguns íons não influenciaram a intensidade nem a posição das bandas de emissão (os espectros completos podem ser vistos na Figura S21). Outros suprimiram parcialmente a fluorescência e outros suprimiram completamente o sinal luminoso dos C-dots. Os efeitos de *quenching* podem estar relacionados com a configuração eletrônica dos cátions metálicos,²¹⁰ apesar de uma correlação linear não ter sido encontrada.

De maneira geral, os metais com subníveis completos, grupos I, II, XII e Al³⁺ (por exemplo, Li⁺, Na⁺ e Zn²⁺ possuem configuração s² e d¹⁰, com exceção do In³⁺) não causaram efeitos significativos na fotoluminescência dos C-dots.

Os íons Ag^+ e Au^+ , apesar de apresentarem configuração d^{10} , apresentaram comportamento anômalo aos demais íons com camadas fechadas. Estes dois íons suprimiram parcialmente a emissão das partículas.

Os íons Ru^{3+} , Pd^{2+} , Zr^{4+} , Fe^{3+} e Ce^{3+} foram os que mais fortemente causaram efeito de supressão. Neste grupo, as propriedades paramagnéticas de alguns deles podem ser a causa da supressão, como já foi reportado em outros trabalhos.^{218,219} As espécies Fe^{3+} e Ru^{3+} interagem fortemente com os grupos $-\text{OH}$ presentes na superfície das partículas, formando complexos não fluorescentes.²¹⁰ Esta maior supressão pode estar relacionada com o fato destes íons possuírem subníveis d não completamente preenchidos, facilitando assim o processo de transferência de carga dos *Carbon Dots* para os íons metálicos. Esta transferência compete com os processos de decaimento radiativos, causando o efeito *quenching* no processo de luminescência. No entanto, não se pode dizer que haja uma correlação linear entre o *quenching* e o preenchimento dos orbitais d , uma vez que os íons Mn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} não suprimiram de forma significativa a emissão radiativa e também possuem o subnível d incompleto.

Outro resultado interessante obtido durante as titulações espectrofluorimétricas foi a mudança de perfil das bandas de emissão causada por diferentes íons. Por exemplo, na Figura 45 é possível observar os espectros de fluorescência das titulações com Na^+ , Au^+ e Fe^{3+} . A adição de íons de sódio não causa nenhuma alteração no perfil da banda de emissão. Com a adição de íons de ferro e de ouro, o comportamento é diferente. À medida em que mais íons são adicionados nas soluções, a intensidade do sinal de fluorescência torna-se menor, no entanto quando as titulações são realizadas com Fe^{3+} ou Ru^{3+} é possível observar que a banda de emissão centrada em 500 nm é suprimida mais rapidamente enquanto que a banda centrada em 430 nm se torna mais evidente. Este fato pode ser um indício de que partículas de diferentes tamanhos se coordenam de diferentes maneiras com determinados íons.

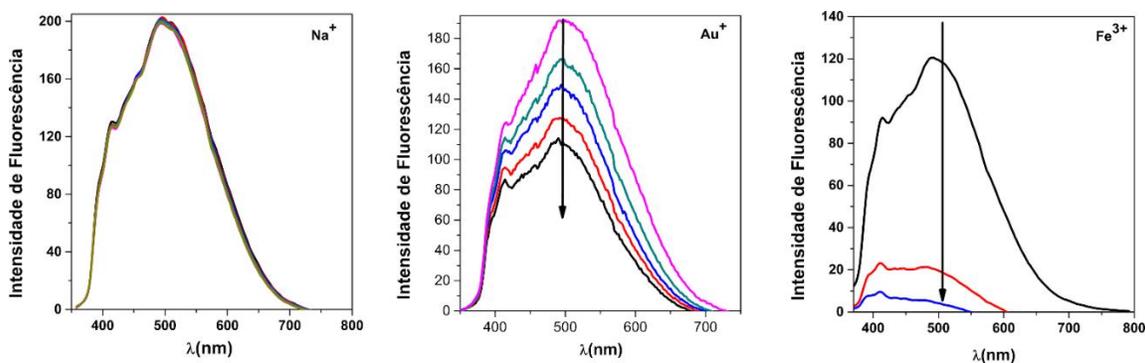


Figura 45. Gráficos dos experimentos de Titulação Espectrofluorimétrica dos C-dots na presença dos íons metálicos: (a) Na^+ , (b) Au^+ , (c) Fe^{3+} .

4.5.1 Fluorescência resolvida no tempo na presença de metais

Experimentos de fluorescência resolvida no tempo também foram realizados para investigar a interação das partículas na presença de alguns cátions (Figura 46). Os dados principais são apresentados na Tabela 7.

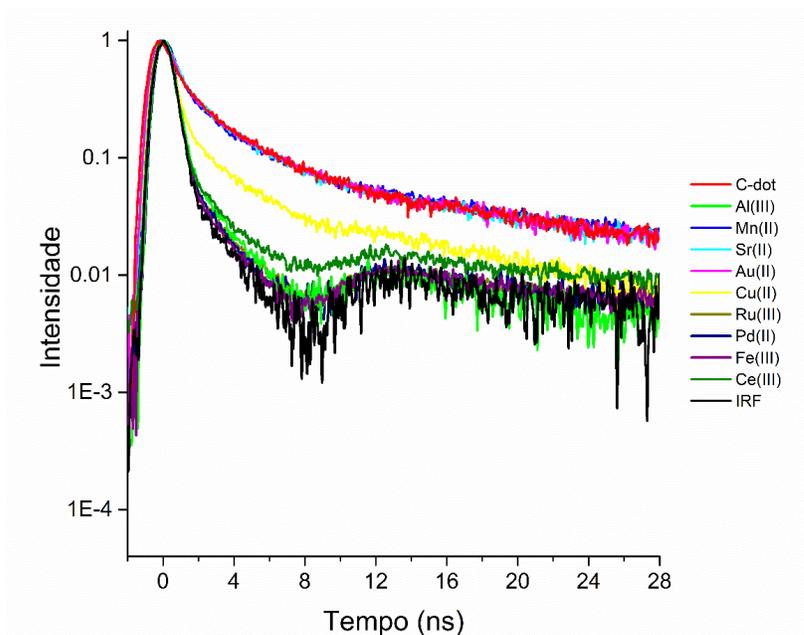


Figura 46. Espectro de emissão de fluorescência resolvida no tempo dos C-dots (16 ppm) na presença de $160 \mu\text{M}$ dos cátions metálicos. IRF = *Instrument response Function*.

Para facilitar a discussão dos resultados dos experimentos de tempo de decaimento, as amostras estudadas foram separadas em quatro categorias, que estão representadas na Tabela 7.

A primeira (#1) está relacionada aos C-dots em solução na ausência de cátions metálicos. Como mostrado anteriormente, estas nanopartículas apresentam dois tempos de decaimento (0,667 ns e 4,494 ns), com o mais curto apresentando população de (~80%) (Tabela 7, entrada 1).

A segunda entrada (#2) está relacionada aos C-dots na presença de cátions com subníveis completos (Al^{3+} , Li^+ e Sr^{2+}) que não causaram supressão na fluorescência das nanopartículas. Neste caso, é observado apenas um tempo de decaimento, assim como observado para os C-dots em solução diluídas (Tabela 7, entrada 3). Como dito antes, os tempos mais curtos, podem estar relacionados às partículas menores presentes em solução.

A terceira entrada (#3) apresenta os C-dots na presença de íons que causaram supressão parcial do sinal luminoso (Mn^{2+} , Cu^{2+} e Au^+). Assim como na entrada #1, são observados dois tempos de decaimento, no entanto a presença destes íons causa aumento na população relacionada ao tempo de vida mais curto.

A última entrada (#4) apresenta o efeito dos íons Ru^{3+} , Pd^{2+} , Fe^{3+} e Ce^{3+} . De maneira semelhante à entrada #2, foi observado apenas o tempo de decaimento mais curto, relacionada às partículas menores. Apesar de as entradas #2 e #4 apresentarem semelhanças no que concerne o tempo de decaimento, seus estados excitados são bastante diferentes. Os metais utilizados na entrada #2, por não causarem efeitos de supressão, não influenciam no decaimento radiativo, permitindo a recombinação HOMO-LUMO após a excitação. Já os metais testados na entrada #4 suprimem completamente o sinal luminoso, isto significa que estes íons não permitem a recombinação dos elétrons, efeito este provavelmente causado por processos de transferência eletrônica (PET = *photoinduced electron transfer*).

Tabela 7. Dados relevantes de Fluorescência Resolvida no Tempo para os C-dots na presença de 160 μM de diferentes cátions metálicos, em que τ é o tempo de vida da fluorescência (em ns) e τ_{av} é a média dos tempos de vida. Os números 1 e 2 são relativos aos diferentes decaimentos observados.

	Comp.	τ_1 (%)	τ_2 (%)	τ_{av}	τ_0/τ
1	C-dot	0,667 (78,96)	4.494 (21,04)	1,472	1.00
	C-dot@Al³⁺	0,245 (100)	-	0,245	6,01
2	C-dot@Li⁺	0,556 (100)	-	0,556	2,65
	C-dot@Sr²⁺	0,869 (100)	-	0,869	1,69
	C-dot@Mn²⁺	0,538 (92,77)	5,467 (7,23)	0,894	1,65
3	C-dot@Cu²⁺	0,358 (97,58)	5,401 (2,42)	0,480	3,07
	C-dot@Au⁺	0,547 (88,23)	4,784 (11,7)	1,045	1,41
	C-dot@Ru³⁺	0,133 (100)	-	0,133	11,07
4	C-dot@Pd²⁺	0,086 (100)	-	0,086	17,12
	C-dot@Fe³⁺	0,207 (100)	-	0,207	7,12
	C-dot@Ce³⁺	0,238 (100)	-	0,238	6,18

4.5.2 Estudo do Efeito *Quenching*

A fim de se compreender de maneira mais detalhada os resultados obtidos na seção anterior, foi decidido estudar a causa da supressão da fluorescência dos C-dots. O *quenching*, supressão do sinal luminoso, pode ser causado por efeitos de *quenching* dinâmico, *quenching* estático, efeito de filtro interno (IFE = *inner filter effect*), decaimentos não radiativos, transferência de energia, fótons e elétrons.^{49,56} Com base nas características dos C-dots e dos íons metálicos, foi decidido investigar os processos de transferência de elétrons como sendo a causa da supressão da fluorescência. Os íons apresentam orbitais d e f semi-preenchidos que podem prontamente aceitar elétrons provenientes dos C-dots. Para investigar a natureza da supressão observada, o método Stern-Volmer foi utilizado, os resultados são apresentados na Tabela 7 e na Figura 47.

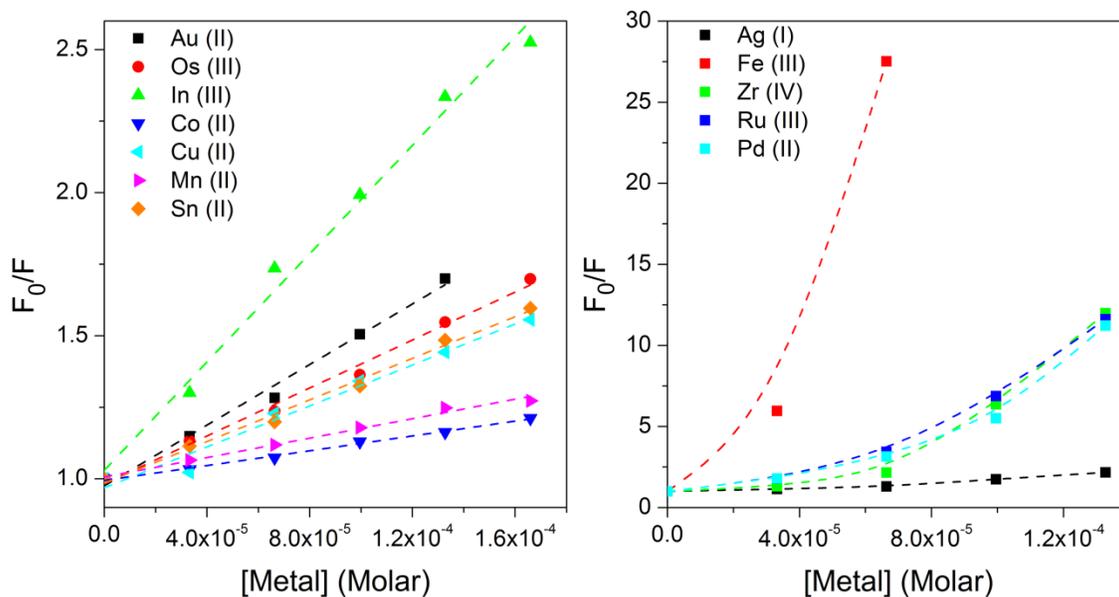


Figura 47. Gráficos de Stern-Volmer dos C-dots na presença de diferentes cátions metálicos. (a) Curva linear. (b) Curvas não lineares.

Os *Carbon dots* apresentaram, na presença dos metais que não causaram *quenching*, uma razão F_0/F praticamente constante (Figura S21). Os íons destes metais apresentam subníveis completos e não podem, portanto, receber elétrons.

A fluorescência dos C-dots, em relação aos cátions do segundo grupo, metais com orbitais disponíveis, apresentaram dependência linear em relação à concentração destes íons (Figura 47a). Este resultado consistente com o efeito de *quenching* estático, com as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e *quenching* bimolecular (K_q) com valores de 10^3 M^{-1} e 10^{12} M^{-1} , respectivamente (Tabela 7).

O gráfico de Stern-Volmer do terceiro grupo de metais apresentou uma curva côncava para cima, em direção ao eixo y (Figura 47b). Este tipo de curva indica a ocorrência de processos estáticos e dinâmicos.⁷⁰ É bem conhecido que desvios da lei de Stern-Volmer podem ocorrer por inúmeras causas.²²⁰ Por exemplo, se a fluorescência ocorre devido à emissão de mais de um estado excitado, as constantes de *quenching* para os vários estados serão diferentes, e em consequência uma equação mais elaborada será necessária para expressar a intensidade do sinal luminoso em função da concentração do *quencher*.²²⁰ Desta maneira, acredita-se que a supressão da fluorescência dos C-dots na presença dos íons pode estar relacionada a várias constantes, relacionadas às diferentes espécies de partículas no estado excitado.

Tabela 7. Dados do método de Stern-Volmer para os C-dots na presença de diferentes cátions, em que K_{SV} é a constante (a 10^3 M^{-1}) de Stern-Volmer, K_q é a constante de *quenching* bimolecular (a $10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e R é o coeficiente de determinação.

Metal	Equação	K_{sv}	K_q	R^2
Os(III)	4044,23 [Q] + 1	4,044	2,747	0,990
In(III)	9708,92 [Q] + 1	9,708	6,595	0,989
Co(II)	1249,57 [Q] + 1	1,249	8,485	0,993
Cu(II)	3318,75 [Q] + 1	3,318	2,254	0,969
Au(I)	5053,69 [Q] + 1	5,053	3,433	0,987
Mn(II)	1751,26 [Q] + 1	1,751	1,190	0,988
Sn(II)	3510,83 [Q] + 1	3,510	2,385	0,991

4.5.2 Estudo do material precipitado

A interação íon-partícula ocorre primeiro por forças de natureza eletrostática. Os íons positivos são atraídos pelas nanopartículas negativamente carregadas. Ao interagirem, a solução coloidal dos C-dots coalesce, como pôde ser visto na Figura 41, na seção anterior. No entanto, a intensidade e consequência destas interações depende da configuração eletrônica do íon. Os agregados carbonáceos presentes em solução podem ser desagregados ou não, dependendo da disponibilidade dos orbitais dos íons presentes. Acredita-se que esse processo de transferência eletrônica se dê principalmente pelas interações dos íons com os grupos fenólicos e carboxílicos presentes na superfície do material.

Para estudar a natureza destas interações, as suspensões contendo os agregados foram centrifugadas, o material precipitado, contendo as partículas C-dots/cátions foi analisado por IV e por microscopia eletrônica. O resultado de IV obtido para o íon de Fe(III) é apresentado na Figura 48, os resultados obtidos para os demais íons são apresentados no apêndice (**Figura S22**). Fica claro ao se observar no espectro do composto **C-dot/Fe** a diminuição da banda de vibração da ligação C=O em 1700 cm^{-1} referente às carbonilas dos ácidos carboxílicos presentes na superfície do material. Verifica-se também o deslocamento da vibração da ligação C-O em 1242 cm^{-1} .

A ocorrência destas observações é um forte indicativo da interação dos grupos funcionais presentes na superfície das partículas com os íons em solução. A supressão das suas bandas de absorção mostra que o material precipitado apresenta características diferentes após interagir com os íons.

Além dos espectros de IV, foi possível também obter imagens de microscopia de alta resolução destes materiais. Na **Figura 49** é possível observar a imagem de uma partícula do composto **C-dots/Fe**.

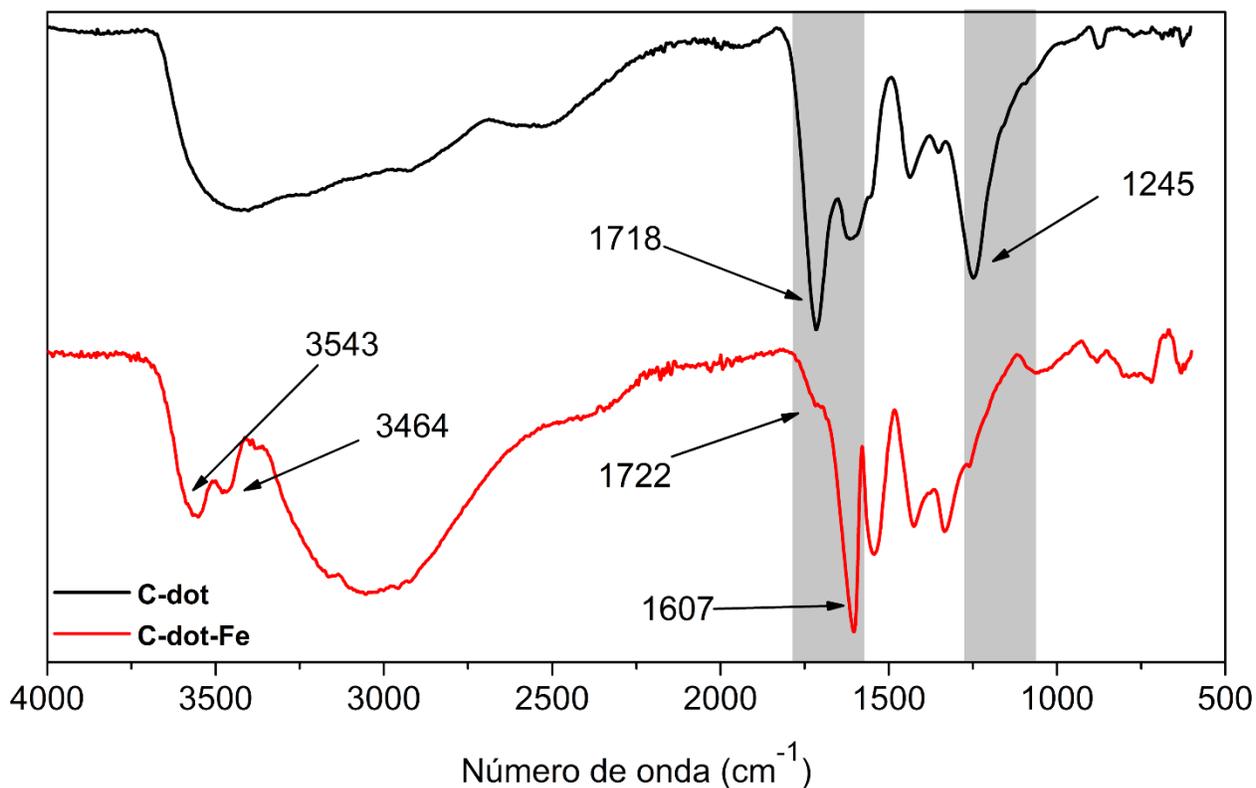


Figura 48. Espectro de IV do material do precipitado da solução contendo C-dots e íons de Fe^{3+} .

A principal diferença dessa imagem, ao se comparar com as imagens dos C-dots puros, é o fato de as partículas encontradas estarem isoladas. Na amostra, não foi observada a presença de aglomerados de partículas no grid. Outro fato importante de ser ressaltado foi percebido com o auxílio do experimento de EDS. Na Figura 49a, é possível observar duas regiões, *a* e *b*, destacadas com círculos brancos. Foram realizadas análises de EDS dessas regiões. O espectro da região *a* revelou uma grande presença de Ferro nos limites da partícula (Figura 49b). O espectro da região *b* mostra que longe dos limites da partícula, a abundância do elemento ferro diminui, indicando a forte interação entre as partículas de carbono e os íons presentes na solução e que o material precipitado é de fato um híbrido dos C-dots com elemento ferro.

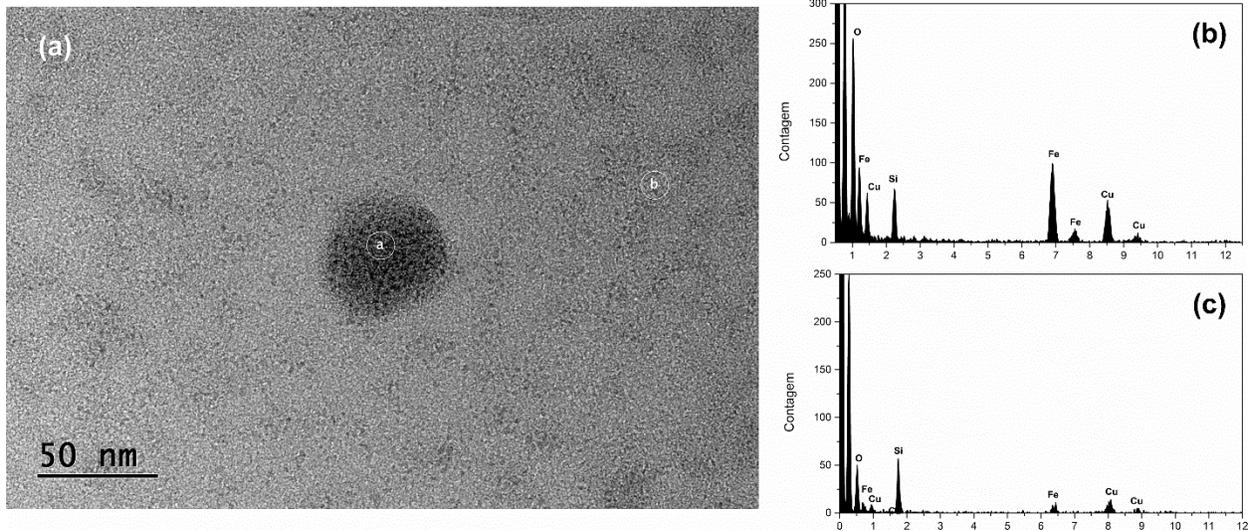


Figura 49. Imagens de microscopia de transmissão (200 kV) precipitado da solução contendo C-dots e íons de Fe^{3+} . (b) Imagem do espectro de EDS da região a. (c) Imagem do espectro de EDS da região b.

5 Conclusões e Perspectivas

De acordo com os dados obtidos na fase de caracterização das nanopartículas de carbono a partir das análises de RMN, IV e XPS, conclui-se que o material é altamente oxidado, com variados tipos de ligações C=C, C-H, C-C, C-O, C=O, O-C=O, O-H. Essas ligações podem ser provenientes de grupos fenóis, cetonas, éteres, estéres e ácidos carboxílicos, os quais devem estar presentes na superfície dos C-dots.

Os *carbon dots* possuem domínios de carbono sp^2 , que são folhas de grafeno existentes de forma desordenada em sua estrutura. Essas “ilhas” dão origem à luminescência observada. As partículas obtidas possuem potencial de superfície negativo, o que permite com que atraiam cátions metálicos para suas proximidades. Dependendo das características dos íons atraídos, o material formado pode possuir propriedades interessantes para posterior aplicação em fotocatalise, uma vez que foi constatado que a presença de alguns íons acelera o processo de decomposição dos C-dots quando irradiados em comprimentos de ondas abaixo de 300 nm. Os C-dots obtidos neste trabalho não puderam ainda ser testados em experimentos de marcação celular. As análises estão em andamento e os resultados serão discutidos em futuros trabalhos.

Na próxima fase deste projeto, pretende-se realizar estudos eletroquímicos dos C-dots em conjunto com os cátions metálicos para complementar os estudos espectroscópicos, bem como titular soluções dos C-dots com alguns dos íons estudados e simultaneamente medir o potencial zeta da solução, para que assim se possa verificar o efeito da presença das cargas positivas no potencial de superfície das partículas.

Capítulo 4
Sessão Experimental

1 Experimental

Os equipamentos utilizados para a caracterização dos materiais desenvolvidos neste trabalho:

Geral. Todos os reagentes foram usados como recebidos sem purificações adicionais. HNO₃ (65%), HCl (37%), NaOH (99%). Soluções aquosas de Na(I), Li(I), Sr(II), Ba(II), Al(III), Cd(II), Hg(II), Zn(II), Ni(II), Co(II), Mn(II), Cu(II), Sn(II), Os(III), Au(I), In(II), Ru(III), Pd(II), Fe(III) e Ce(III) foram preparadas a partir de seus cloretos. Solução aquosa de Ag (I) foi preparada a partir do seu sal de nitrato. Solução aquosa de Zr (IV) foi preparada a partir de seu oxiclreto. Água deionizada foi utilizada em todas as análises.

Síntese dos C-dots: Os *carbon dots* estudados nesse trabalho foram sintetizados a partir de carvão ativo comercial. 5 g de CA foram colocados em um balão de 250 mL, em seguida foi adicionado 100 mL de uma solução de HNO₃ 5 M. O sistema foi refluxado por 48 horas a 150 °C. O material obtido foi centrifugado a 2500 rpm, o sobrenadante foi separado do precipitado. A solução obtida foi colocada em um béquer e colocada para evaporação para diminuição de seu volume. Em seguida, a solução foi filtrada em filtros de 0,45 µm e depois em filtros de 0,22 µm de diâmetro de poro. Depois da filtração, a solução contendo as partículas de carbono foram centrifugadas a 13000 rpm por duas horas. A solução final foi colocada para evaporação, obtendo-se 500 mg de C-dots.

Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis): Os espectros de UV-Vis foram registrados de soluções aquosas de 0,4 mg mL⁻¹ dos nanomateriais, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, usando-se um espectrofotômetro Cary UV-50.

Espectroscopia de Infravermelho: Os espectros no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos numa região de 4000-500 cm⁻¹ utilizando o espectrômetro Bruker modelo Alpha-P.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro Varian 400 MHz.

Espectrometria de Massas: As análises de ESI-MS foram obtidas a partir de um aparelho Waters micromass Q-TOF MicroTM.

Espectrofotômetro de Fluorescência: Os espectros de fluorescência foram realizados em um espectrofotômetro Cary Eclipse Spectrophotometer Varian. As medidas foram realizadas à velocidade média, com alta voltagem, com *slit* de excitação com abertura de 5, e *slit* de emissão com abertura de 2,5.

Potencial zeta e análises de DLS: Os potenciais zeta e medidas de raio hidrodinâmico foram medidos em um Zetasizer Nano-ZS90, utilizando soluções aquosas ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em pH 5 das amostras. As medidas foram realizadas em triplicata.

Fluorescência resolvida no tempo: As análises foram realizadas por múltiplas contagens de fótons relacionada com o tempo no equipamento Easy Live. O método dos mínimos quadrados não-linear foi utilizado para ajustar o decaimento para uma soma de exponenciais. O valor de χ^2 e uma inspeção visual dos resíduos e a função de autocorrelação foram usadas para determinar a qualidade do ajuste. Aproximação para decaimento mono-exponencial $\text{Fit} = A + B_1 \exp(-t/\tau_1) + B_2 \exp(-t/\tau_2)$ foi utilizada.

Espectroscopia de Fotoelétrons Induzidos por Raios X (XPS): As medidas de XPS foram obtidas com uma energia de 1,84 keV na estação SXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas, SP.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): A caracterização morfológica nanoestrutural das amostras foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens foram registradas em um microscópio JEOL modelo JEM1200 EXII operado em 80 kV, e as análises de microscopia de alta resolução foram realizadas no equipamento JEOL operado em 200 kV, ambos disponíveis no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS. Para a análise de MET as amostras foram preparadas por dispersão de poucos miligramas de NPs em acetona à temperatura ambiente. Essa solução foi homogeneizada em ultrassom por 10 min. Duas gotas dessa solução foram depositadas sobre uma tela de Cu (400 *mesh*) revestida com um filme de carbono.

Método de titulação: Neste experimento, 15 mL de uma solução NaOH 0,1 M foi misturado com 20 μL de uma solução de C-dots a $1,0 \times 10^4$ ppm. Ácido clorídrico 0,1 foi adicionado em pequenos volumes (200-20 μL) usando uma micropipeta.¹⁶¹ Os valores de pKa foram calculados fazendo a derivada do volume em relação ao pH.¹⁸⁴

Microscopia confocal de varredura a LASER: As imagens celulares foram obtidas em microscópio confocal de varredura a LASER Leyca, modelo TCS SP5. As imagens foram adquiridas com laser operando a 25% de potência, em modo de duas varreduras por linha e com “pinhole” em abertura de 0,95 μm .

Experimentos Biológicos: Todos os derivados BTDs foram diluídos em água na presença de DMSO (abaixo de 0,1%) no meio celular suplementado com 10% de soro bovino fetal. As seguintes linhagens celulares foram utilizadas: A2780, MCF-7, T4D7 e HUVEC. As amostras celulares foram mantidas de acordo com a ATCC (*American Type Culture Collection*) a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

Viabilidade celular. Para os testes de viabilidade celular, foram aplicadas soluções de diferentes concentrações. 10 e 100 μM . As células foram encubadas com os derivados BTDs por até 24 horas e analisadas por ensaios padrões de MTT, seguindo as recomendações (R&D System Inc, MN, USA). Brevemente, 3×10^3 células de cada linhagem foram colocadas em uma placa e mantidos a 37 °C por 8 horas. As células foram encubadas com 150 μL de uma solução 0,5 mg mL⁻¹ de MTT no meio de cultura por 4 horas no escuro a 37°C. MTT é reduzido pelo metabolismo celular a cristais insolúveis do corante roxo formazan que se acumulam no citoplasma. A solução de MTT é removida e 200 μL de DMSO são adicionados em todas as amostras para solubilizar o formazan. A placa é analisada em um espectrofotômetro e o λ de absorção é 570 nm. O ensaio de MTT foi realizado em triplicatas. A viabilidade celular foi determinada pela medida de MTT obtida para as amostras testadas comparadas com o a amostra de controle nas mesmas condições, seguindo a seguinte expressão: (Sobrevivência % = [(amostra testada)/(amostra controle)] \times 100).

Experimentos de Bioimageamento: Células foram cultivadas em uma placa de petri de 13 mm, foram colocadas para aderir por 8 horas, depois foram lavadas três vezes com soro para a remoção de células não aderidas. Após confluência, as células foram divididas em duas amostras: vivas e fixadas. As células vivas foram encubadas por 30 minutos com uma solução 1 μM de cada composto a 37 °C. Estas amostras foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos. As amostras foram lavadas novamente com PBS 1 X

(pH 7.4) a temperatura ambiente. Em seguida, as tampas foram colocadas por cima das lâminas de vidro usando Prolong Gold Antifade (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras fixadas foram lavadas três vezes com PBS e depois fixadas com formaldeído 3,7% por 30 minutos. Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas três vezes com PBS a temperatura ambiente e incubadas por 30 minutos com soluções 1 μ M de cada composto. O controle negativo foi realizado com incubação das amostras em 0,1% de DMSO. As amostras foram analisadas utilizando um microscópio confocal e excitadas usando comprimento de onda de 405 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Análises de EPR e quantificação de ROS: Para realizar estes ensaios, células MCF-7 foram cultivadas e aderidas a uma placa de petri por 24 horas. Após esse período, as células foram incubadas com N-acetilcisteína (NAC, 20 μ M) 5 mM ou Menadiona (100 μ M) ou com **BTD-4APOc** (10 ou 100 μ M). O controle negativo foi realizado incubando as amostras com meio de cultura celular DMEM. Após os tratamentos, foram adicionados às amostras 20 μ L de 1-hidroxi-3metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametil-pirrolidina (CMH). Após 25 minutos as amostras foram incubadas com CMH, 400 mL do sobrenadante foram coletadas de todas as amostras. Em seguida, a sonda de ROS foi adicionada. Os experimentos de EPR foram então realizados em duplicatas. As medidas foram realizadas em um espectrômetro equipado com uma Banda-X (9 GHz) de alta sensibilidade. A altura do pico foi utilizada para detecção do sinal. Uma curva de calibração foi obtida utilizando o radical nitroxido diluído em solução tampão de Krebs-Henseleit nas seguintes concentrações: 0, 5, 10, 50 e 100 μ M. Nesta faixa de concentração, uma curva linear é obtida e os dados foram coletados nesta faixa. Todos os resultados são expressos como \pm SEM. Os testes estatísticos utilizados neste estudos estão anotados nas legendas das figuras. $P < 0,005$ foi considerado estatisticamente significativo.

1.1 Síntese dos derivados BTDs

Síntese do BTD-4AP, (4-(4-aminopiridina)-2,1,3-benzotiadiazola). 4-bromo-2,1,3-benzotiadiazola (100 mg, 0,4 mmol), 1,4-aminopiridina (65,0 mg, 0,7 mmol), (Pd(OAc)₂ (5,0 mg, 5 mol%), DPEPhos (12 mg, 5 mol%), e *t*BuOK (100 mg, 0,9 mmol) foram misturados em tolueno (5 mL) em um tubo Schlenk. A mistura reacional foi agitada a 120 °C por 72 horas. Em seguida, a reação foi resfriada e filtrada em Celite utilizando acetato de etila como solvente. O material obtido foi concentrado e purificado por coluna cromatográfica utilizando gradiente de polaridade de acetato de etila e hexano até (EtOAc/Hexano 50:50 v/v). O produto desejado foi obtido com 80% de rendimento. Ponto de Fusão: 140.5-142.0 °C. IV (cm⁻¹) 3418, 2925, 1594, 1420, 1150, 990. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 8.38-8.33 (m, 2H), 7.66-7.56 (m, 2H), 7.48-7.44 (m, 1H), 7.22-7.18 (m, 2H). RMN ¹³C-(¹H) (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 155.4, 149.8, 148.9, 148.8, 132.5, 130.5, 114.3, 111.4, 111.1. HRMS (ESI-Q-TOF) calcd. para [C₁₀H₉N₄S+H]⁺ 229.0548, encontrado: 229.0581.

Síntese do BTD-4APBu, (Brometo de 4-(1-butil-4-aminopiridínio)-2,1,3-benzotiadiazola). 1-Bromobutano (300 mg, 2,0 mmol) e **BTD-4AP** (50 mg, 0,2 mmol) foram misturados em MeCN, 5,0 mL) em um tubo Schlenk. A mistura reacional foi agitada a 90 °C por 24 horas. Em seguida, o Schlenk foi resfriado e o solvente evaporado. Foi obtido um óleo e este foi lavado com acetato de etila até não mais se observar os produtos de partida por CCD. O produto final foi obtido na forma de um óleo amarelo escuro com 50% de rendimento (0.1 mmol, 37 mg). IV (cm⁻¹): 3420, 3020, 2850, 1649, 1537, 1461, 1190. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 8.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.03-8.01 (m, H), 7.80-7.71 (m, 2H), 7.24 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 4.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.90 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.41 (sex, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.01 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H). ¹³C-(¹H) RMN (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 155.7, 155.6, 149.3, 142.3, 129.7, 128.8, 123.3, 119.9, 109.9, 58.5, 33.0, 19.2, 13.4. HRMS (ESI-Q-TOF) calcd. para [C₁₅H₁₇N₄S]⁺, 285.1174, encontrado: 285.1127.

Síntese do BTD-4APOc (Brometo de 4-(1-octil-4-aminopiridínio)-2,1,3-benzotiadiazola). 1-Bromooctano (300 mg, 2,0 mmol) e **BTD-4AP** (50 mg, 0,2 mmol) foram misturados em MeCN, 5,0 mL) em um tubo Schlenk. A mistura reacional foi agitada

a 90 °C por 24 horas. Em seguida, o Schlenk foi resfriado e o solvente evaporado. Foi obtido um óleo e este foi lavado com acetato de etila até não mais se observar os produtos de partida por CCD. O produto final foi obtido na forma de um óleo amarelo escuro com 60% de rendimento. IV (cm^{-1}): 3130, 2936, 1680, 1517, 1460, 1124, 841. RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 v/v) δ (ppm) 8.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.82-7.79 (m, 1H), 7.55-7.53 (m, 2H), 7.18 (br, 2H), 4.15 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H), 1.87-1.60 (m 2H), 1.29-1.00 (m, 10H), 0.72 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H). RMN ^{13}C -(^1H) (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 v/v) δ (ppm) 155.47, 155.43, 149.3, 142.2, 129.5, 128.6 (2C), 122.4, 119.8, 58.7, 31.3, 30.9, 28.65, 28.62, 25.7, 22.2, 13.6. HRMS (ESI-Q-TOF) calcd. para $[\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{S}]^+$, 341.1800, encontrado: 341.1863.

Síntese do BTD-4APBuP (*N*-(1-(4-(triphenylphosphonium)butyl)-4-pyridinium)-2,1,3-benzotiadiazola-4-amine di-bromide). BTD-4AP (11.5 mg, 0.05 mmol) e (brometo de 4-bromobutil-trifenilfosfônio (238 mg, 0.5 mmol) foram misturados em 5 mL de DMF em tubo Schlenk. A mistura reacional foi agitada a 70 °C por 24 horas. Em seguida, o Schlenk foi resfriado e o solvente evaporado. Foi obtido um óleo e este foi lavado com acetato de etila até não mais se observar os produtos de partida por CCD. O produto final foi obtido na forma de um óleo amarelo escuro com 27% de rendimento. IV (cm^{-1}): 3060, 3051, 984, 2925, 1667, 1450, 1114, 808. RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 v/v) δ (ppm) 8.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.85-7.45 (m, 20H), 4.67 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.91-3.83(m, 2H), 2.51-2.43 (m, 2H), 1.92-1.83 (m, 2H). RMN ^{13}C -(^1H) (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 v/v) δ (ppm) 155.6, 155.4, 149.5, 143.3, 135.2-135.1 (d, $J = 10$ Hz, 3C), 133.3-133.2 (d, $J = 10.0$ Hz, 6C), 130.5-130.3 (d, $J = 20.0$ Hz, 6C), 129.6, 129.0, 121.9, 121.8, 118.1-117.2 (d, $J = 90.0$ Hz, 3C), 43.7, 32.0-31.9 (d, $J = 10.0$ Hz), 21.6-21.1 (d, $J = 50.0$ Hz), 19.39-19.36 (d, $J = 3.0$ Hz) RMN ^{31}P -(^{13}C) (161 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 v/v) δ (ppm) 24.4. HRMS (ESI-Q-TOF) calcd. para $[\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{PS}]^{2+}$, 273.1004, encontrado: 273.1049.

1.2 Espectros

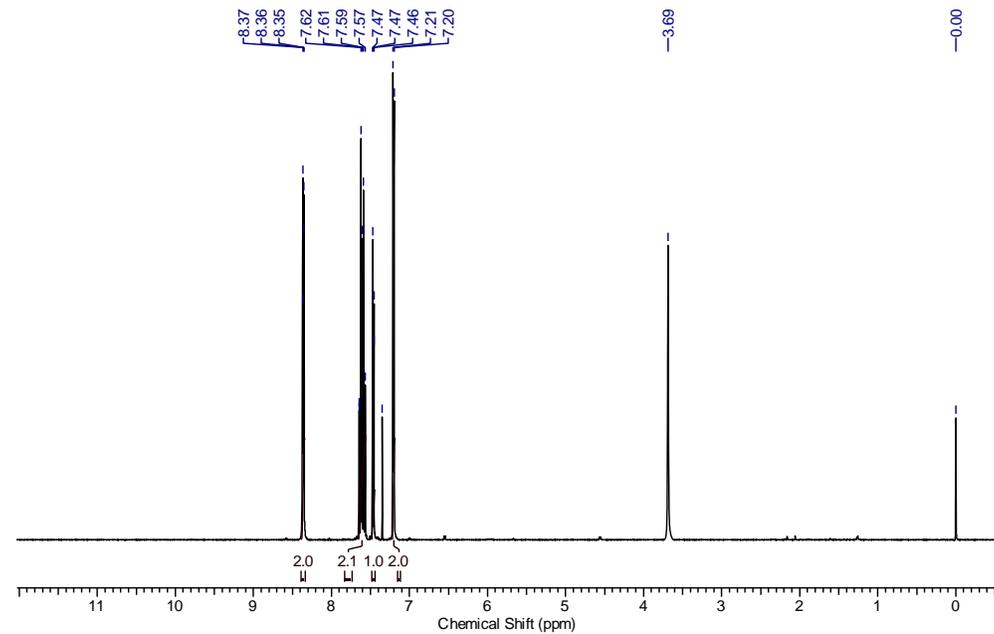


Figura S1. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) do BTD-4AP.

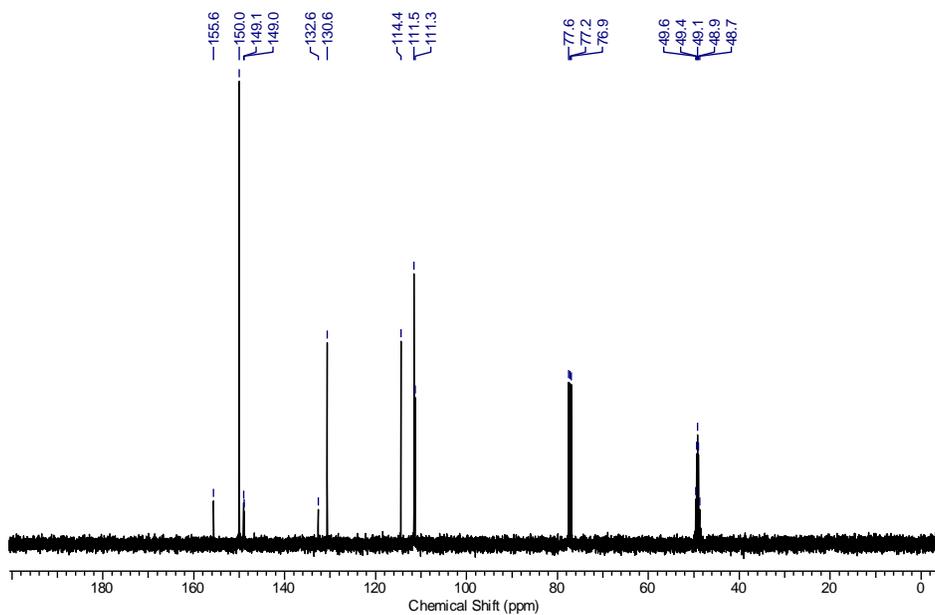


Figura S2. RMN ¹³C (APT, 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) do BTD-4AP.

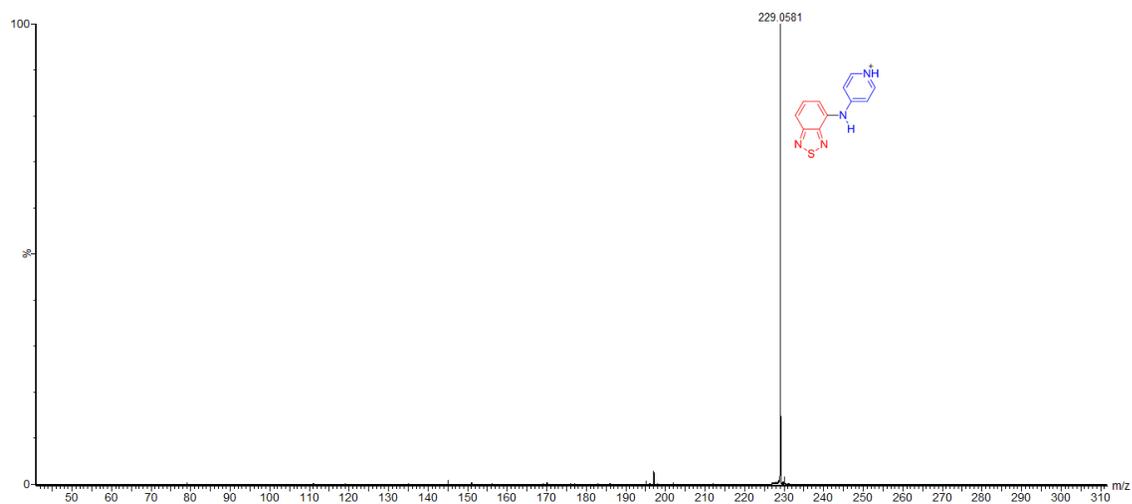


Figura S3. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon [BTD-4AP + H]⁺.

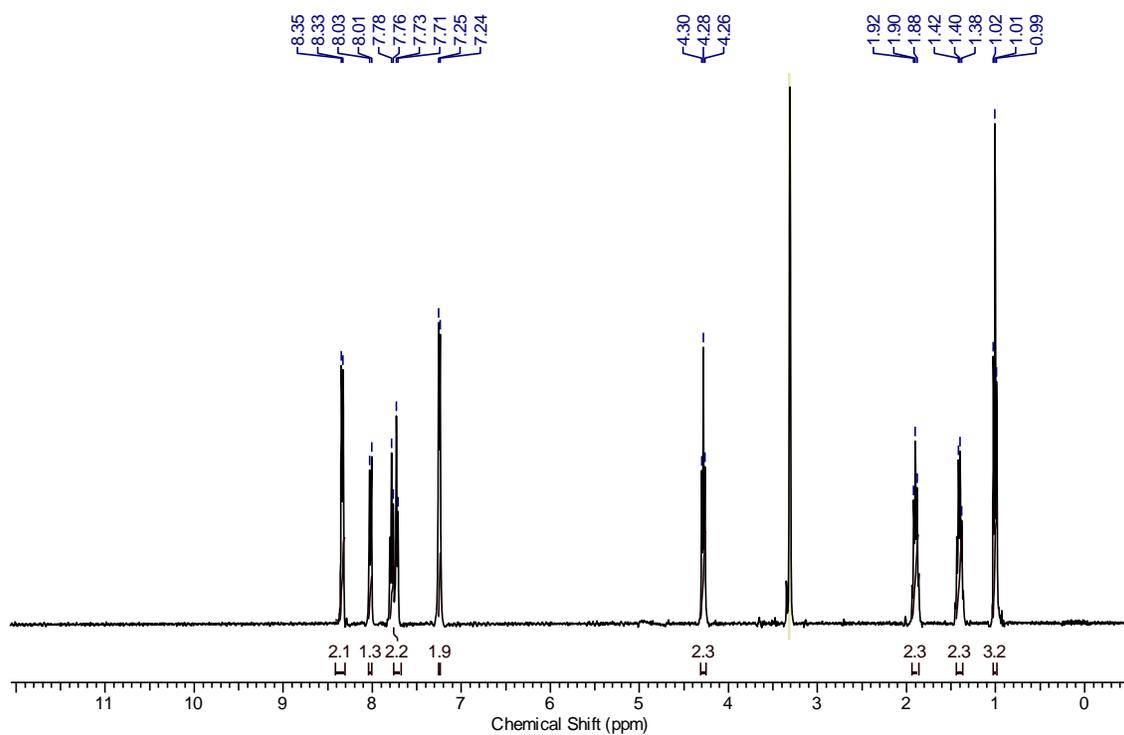


Figura S4. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) do **BTD-4APBu**.

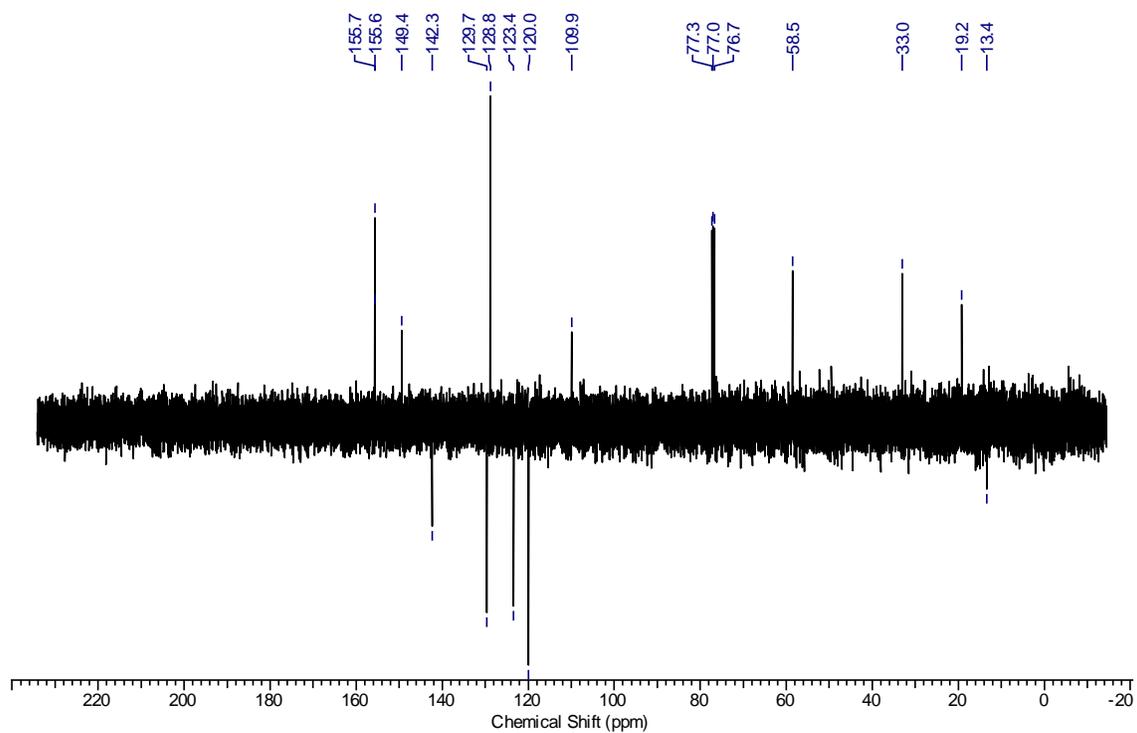


Figura S5. RMN ^{13}C (APT, 100 MHz, CDCl_3) do BTD-4APBu.

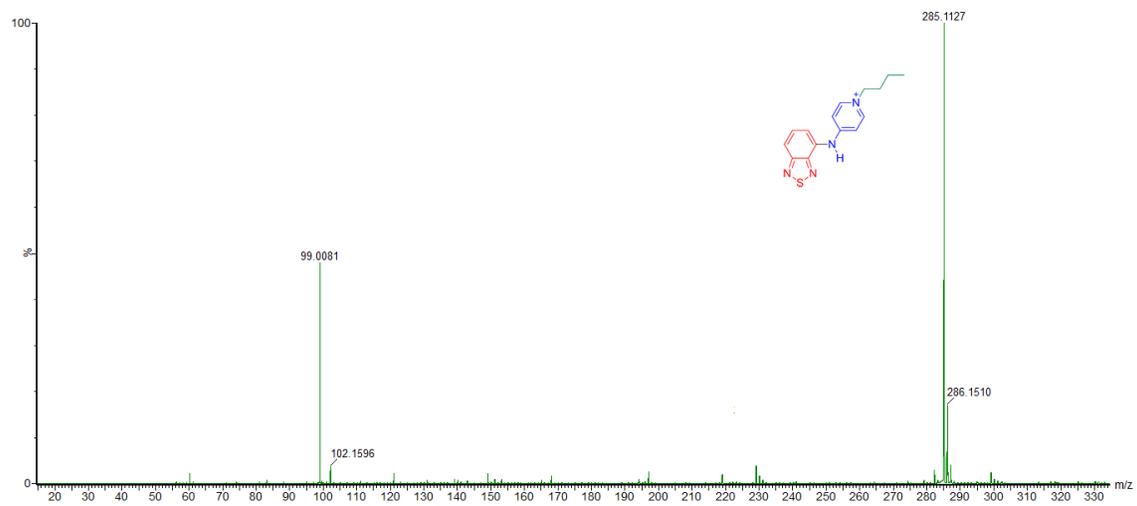


Figura S6. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon $[\text{BTD-4APBu}]^+$.

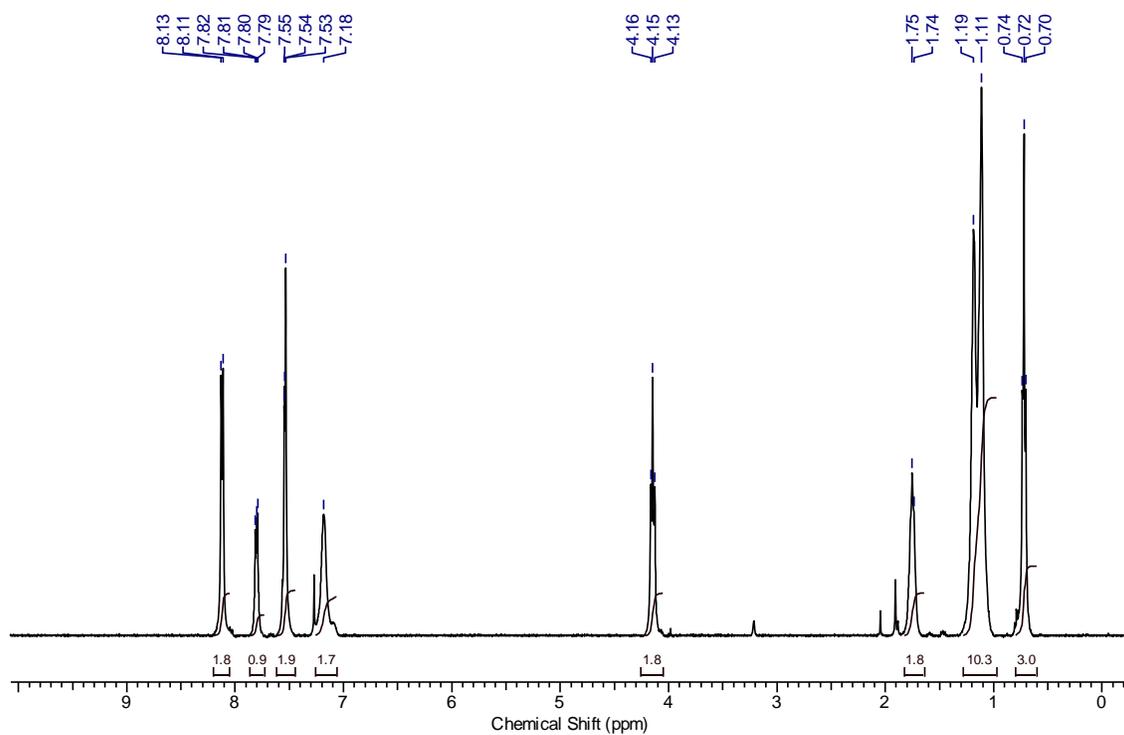


Figura S7. RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do **BTD-4APOc**.

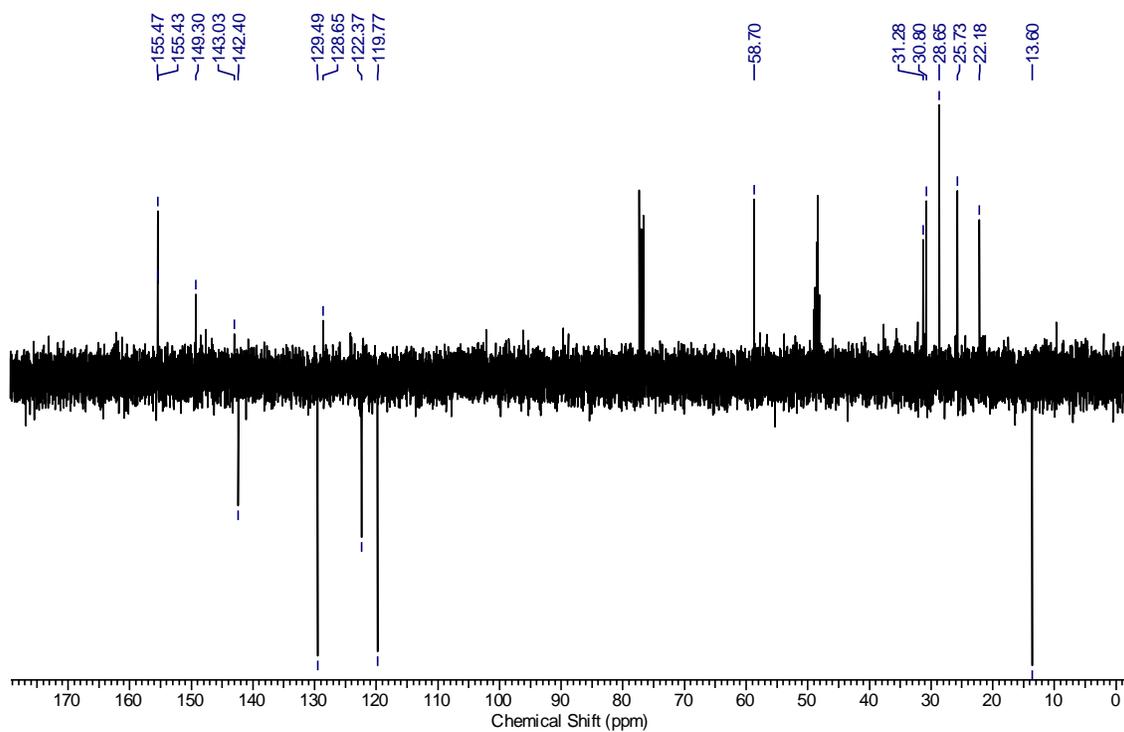


Figura S8. RMN ^{13}C (APT, 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do **BTD-4APOc**.

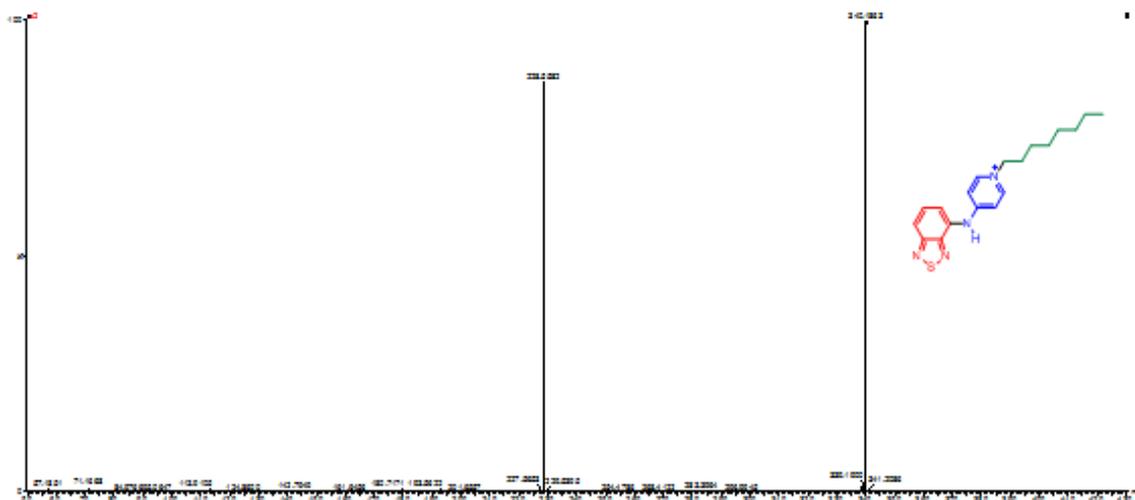


Figura S9. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon [BTD-4APOc]⁺.

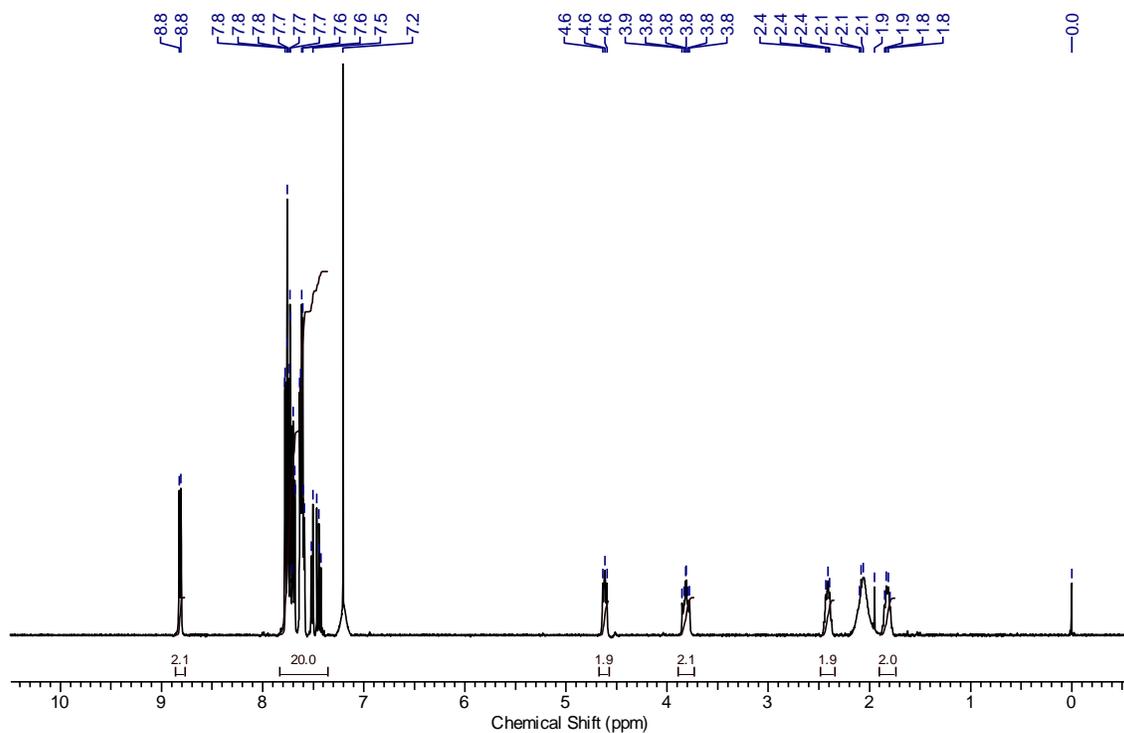


Figura S10. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) do BTD-4APBuP.

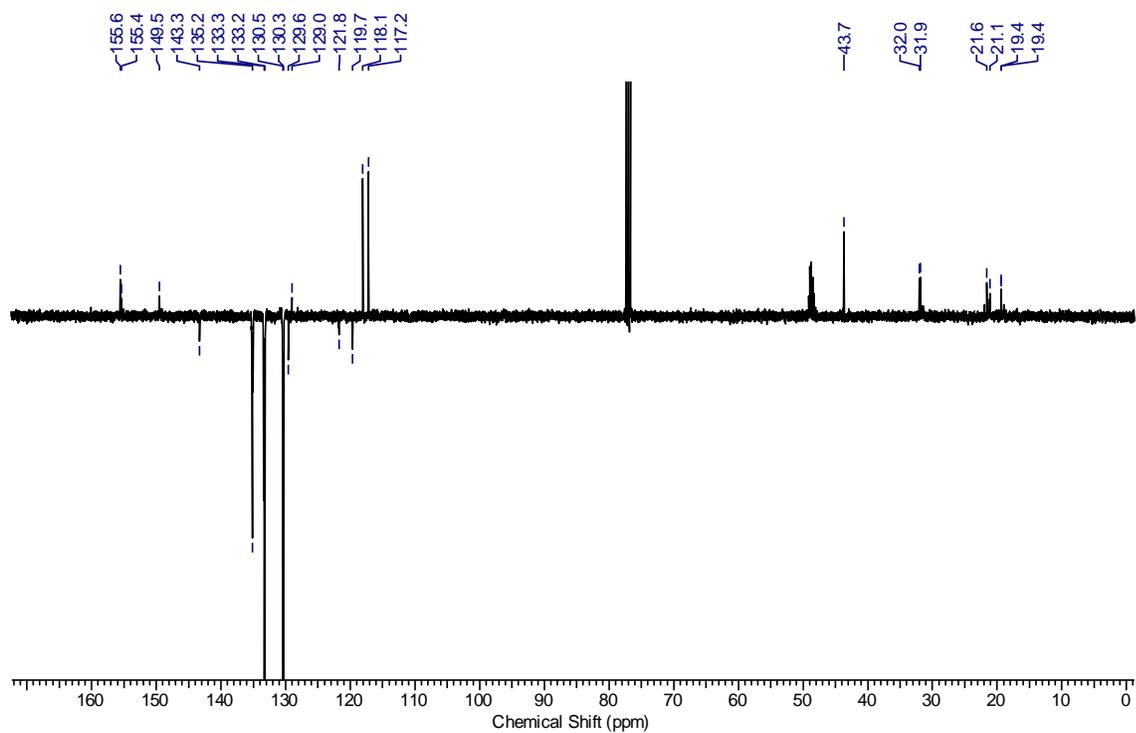


Figura S11. RMN ^{13}C (APT, 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do **BTD-4APBuP**.

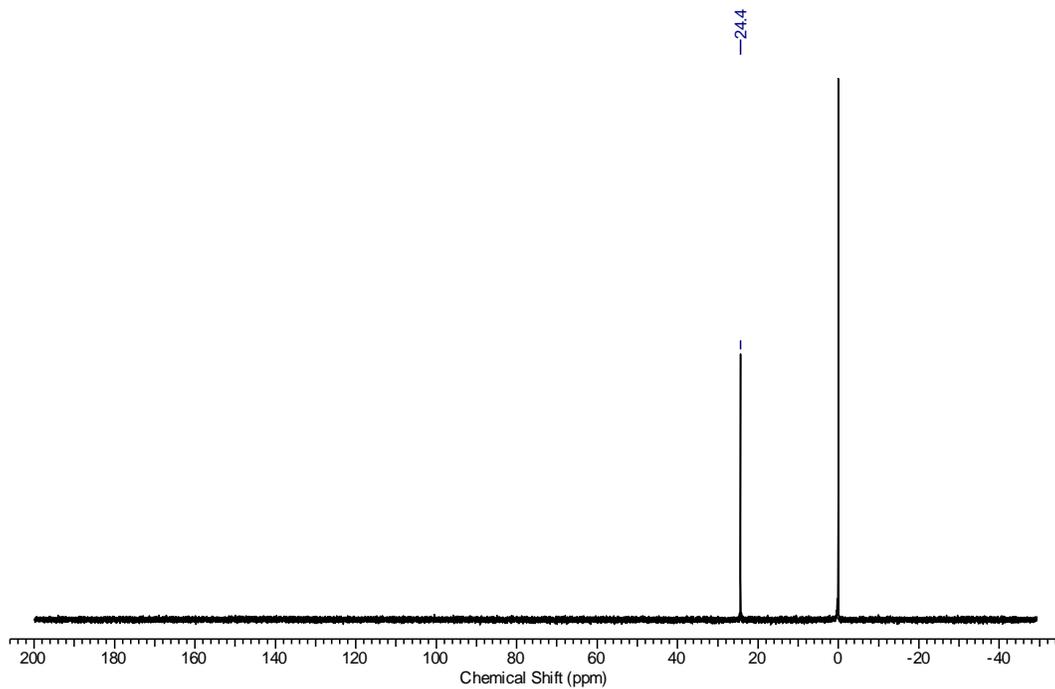


Figura S12. RMN ^{31}P (161 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, H_3PO_4 como referência de 0.0 ppm) do **BTD-4APBuP**.

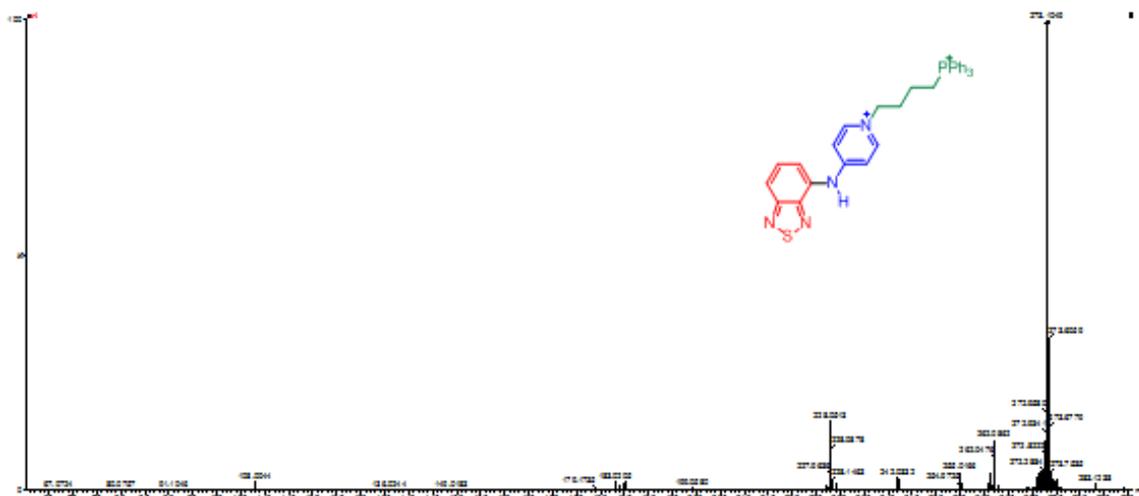


Figura S13. Espectro de ESI(+)-MS/MS do íon $[BTD-4APBuP]^{2+}$.

1.3 Bioimageamento

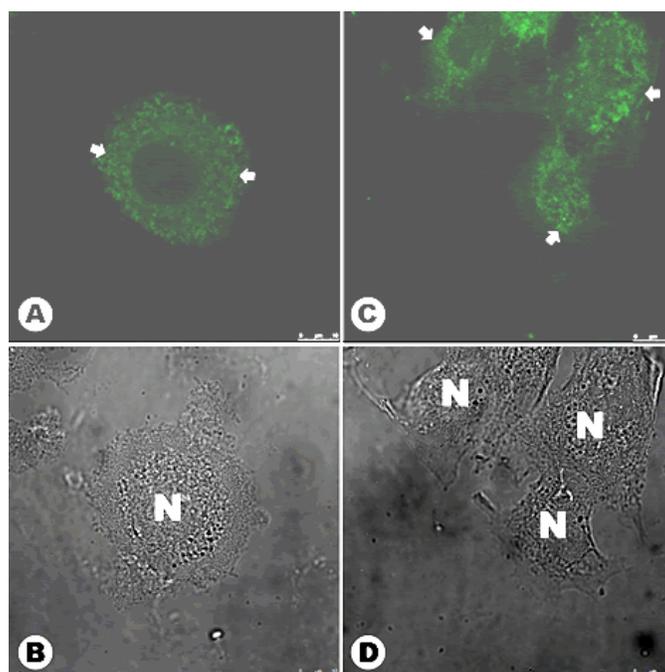


Figura S14. Células tumorais MCF-F marcadas com **BTD-4AP** ($1 \mu M$). (A) e (B) células vivas. (C) e (D) células fixadas. Um sinal fluorescente não específico é observado no

citoplasma das células em ambas as amostras. A letra N indica o núcleo das células. Barra da escala de 10 μm .

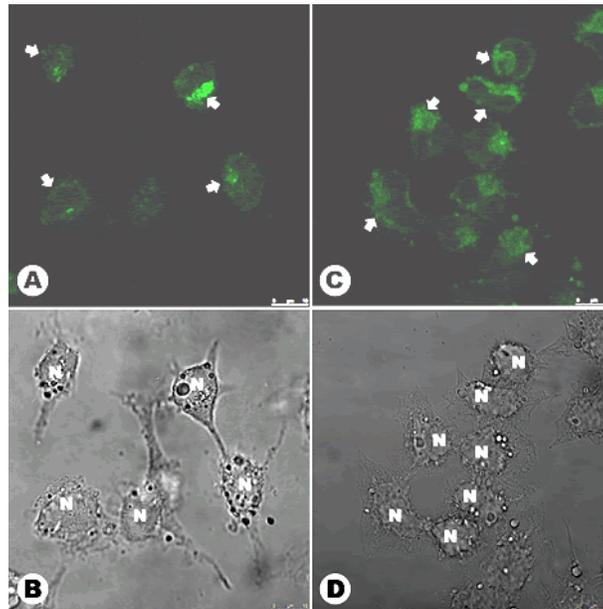


Figura S15. Células tumorais A2780 marcadas com **BTD-4APBu** (1 μM). (A) e (B) células vivas. (C) e (D) Células fixadas. Observe a acumulação no citoplasma (setas brancas) em uma região próxima ao núcleo das células em ambas as amostras, uma região rica em mitocôndrias. A letra N indica o núcleo das células. Barra da escala de 10 μm .

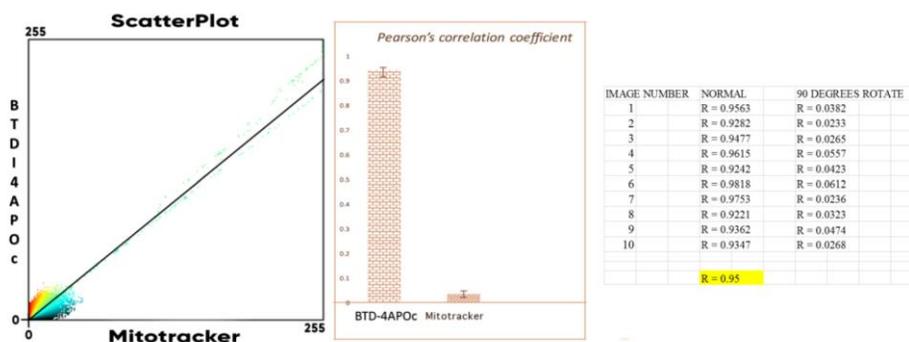


Figura S16. Coeficiente de correlação de Pearson obtido a partir de 10 imagens dos experimentos de bioimageamento com células MCF-7 marcadas com **BTD-4APOc**. O gráfico de dispersão à esquerda está de acordo com os resultados ordinários da regressão dos mínimos quadrados. A imagem no centro apresenta o PCC das imagens com os respectivos controles negativos. Os dados à direita são os valores de PCC para cada uma das imagens e os valores com rotação de 90°.

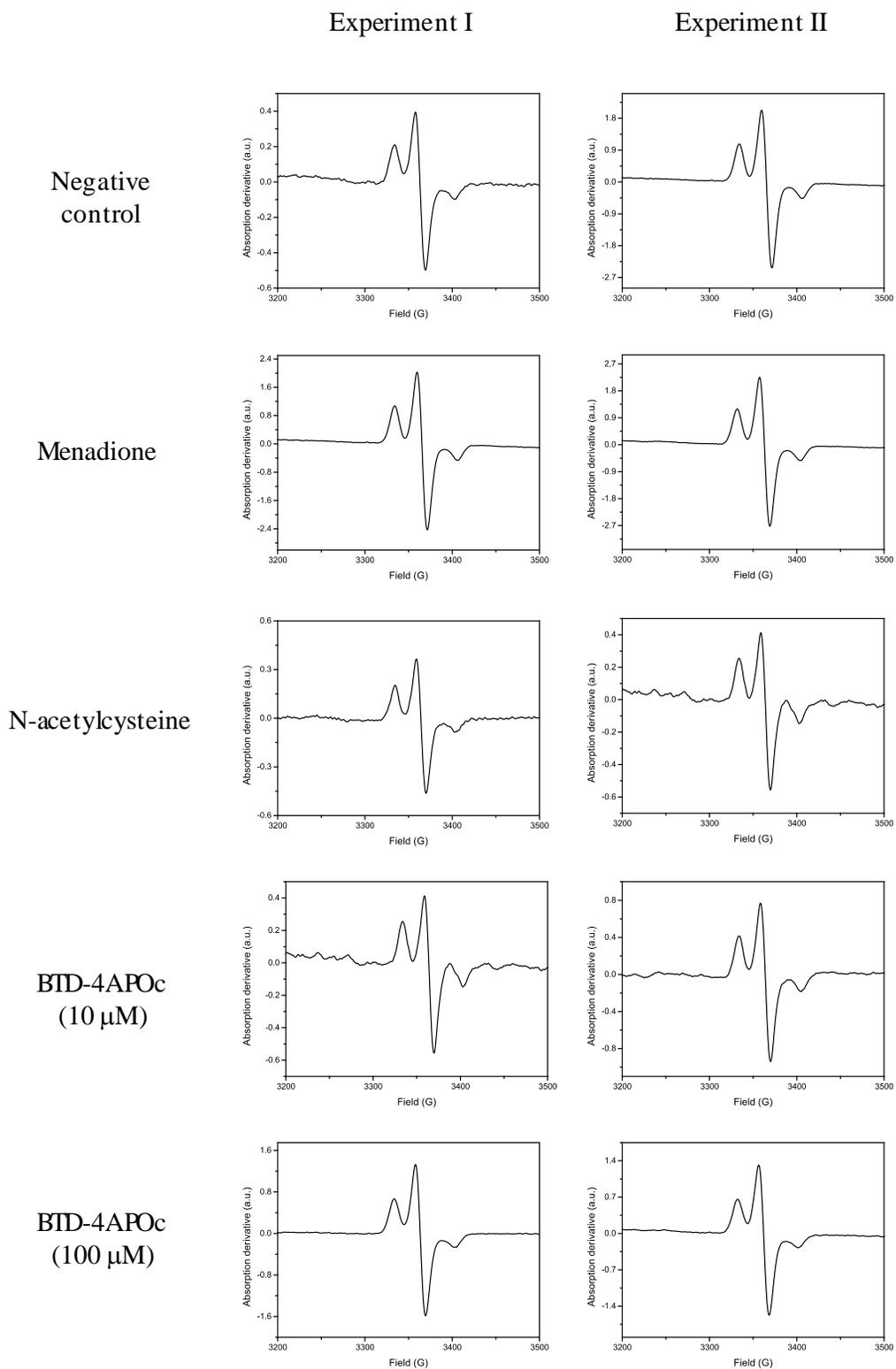


Figura S17. Resultados dos experimentos de EPR para se avaliar a formação das espécies ROS formadas no meio intracelular.

1.4 Síntese dos C-dots

Depois do refluxo, o material foi centrifugado a 3500 rpm para remoção do material não solúvel, em seguida o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,45 mm. O material filtrado foi centrifugado a 6000 rpm, o sobrenadante foi removido e levado novamente à centrifugação de 13000 rpm e filtrado em membranas de 0,22 μm . A água foi removida e foram obtidos **C-dots**, de caráter altamente higroscópicos.

1.5 Dados CHN

Tabela S1. Dados obtidos da análise elementar.

Amostra	%C	%H	%N
CA	73,45	1,76	0,12
	73,3	1,89	0,15
Média	73,375	1,825	0,135
C-dot	51,58	1,69	1,09
	51,04	1,81	1,12
Média	51,31	1,75	1,105

1.6 Espectros de Fluorescência

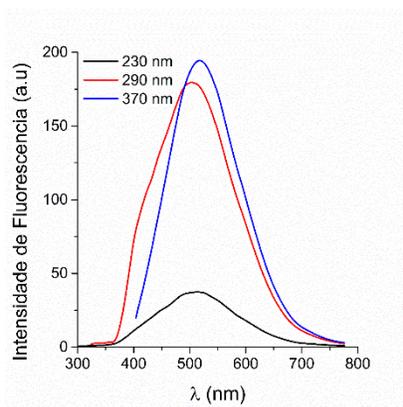
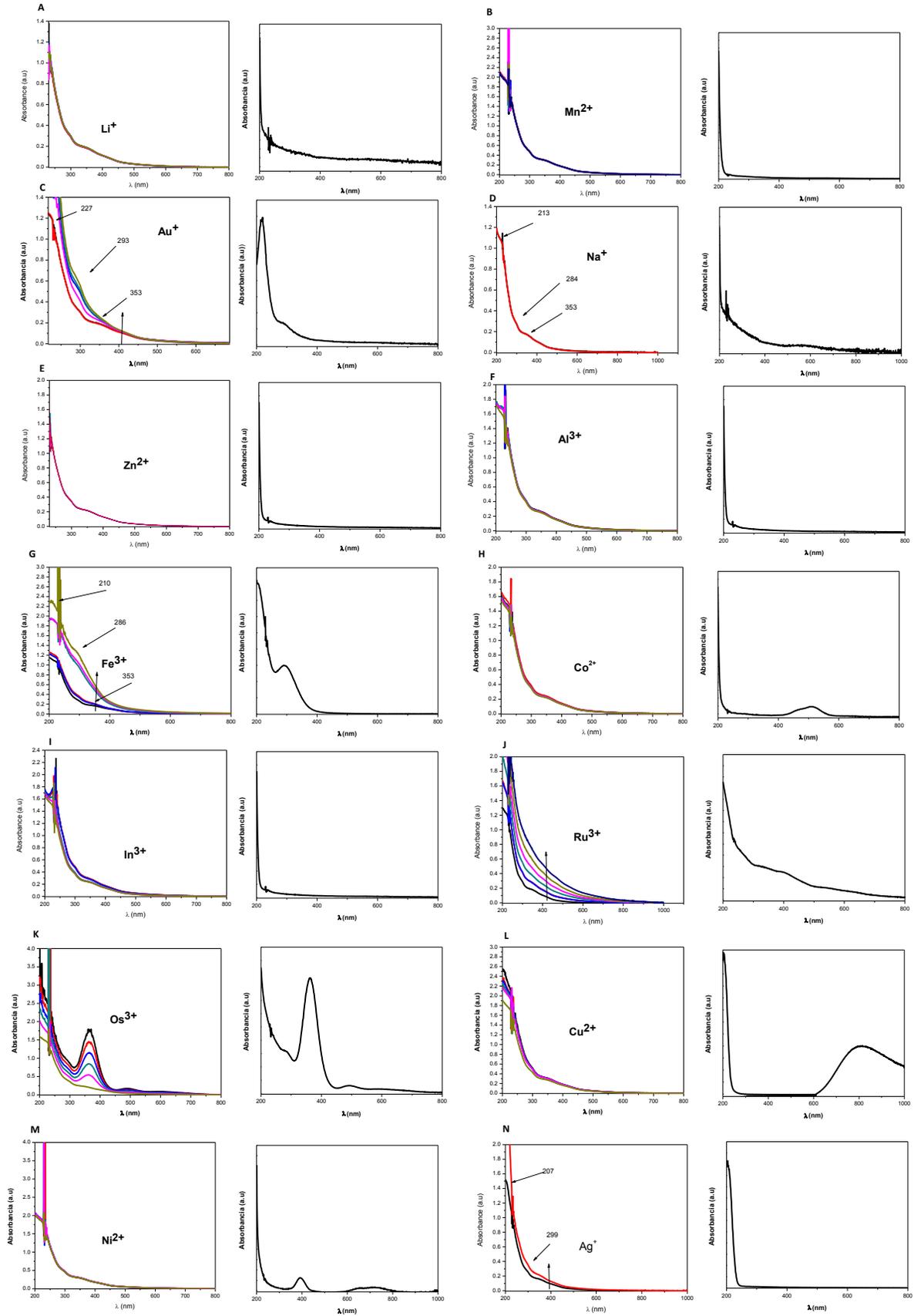


Figura S18. Emissão de fluorescência das bandas de absorção, localizadas em 227, 290 e 370 nm, observadas no espectro de UV-Vis.



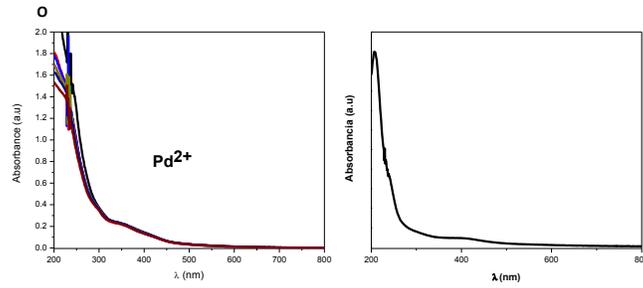
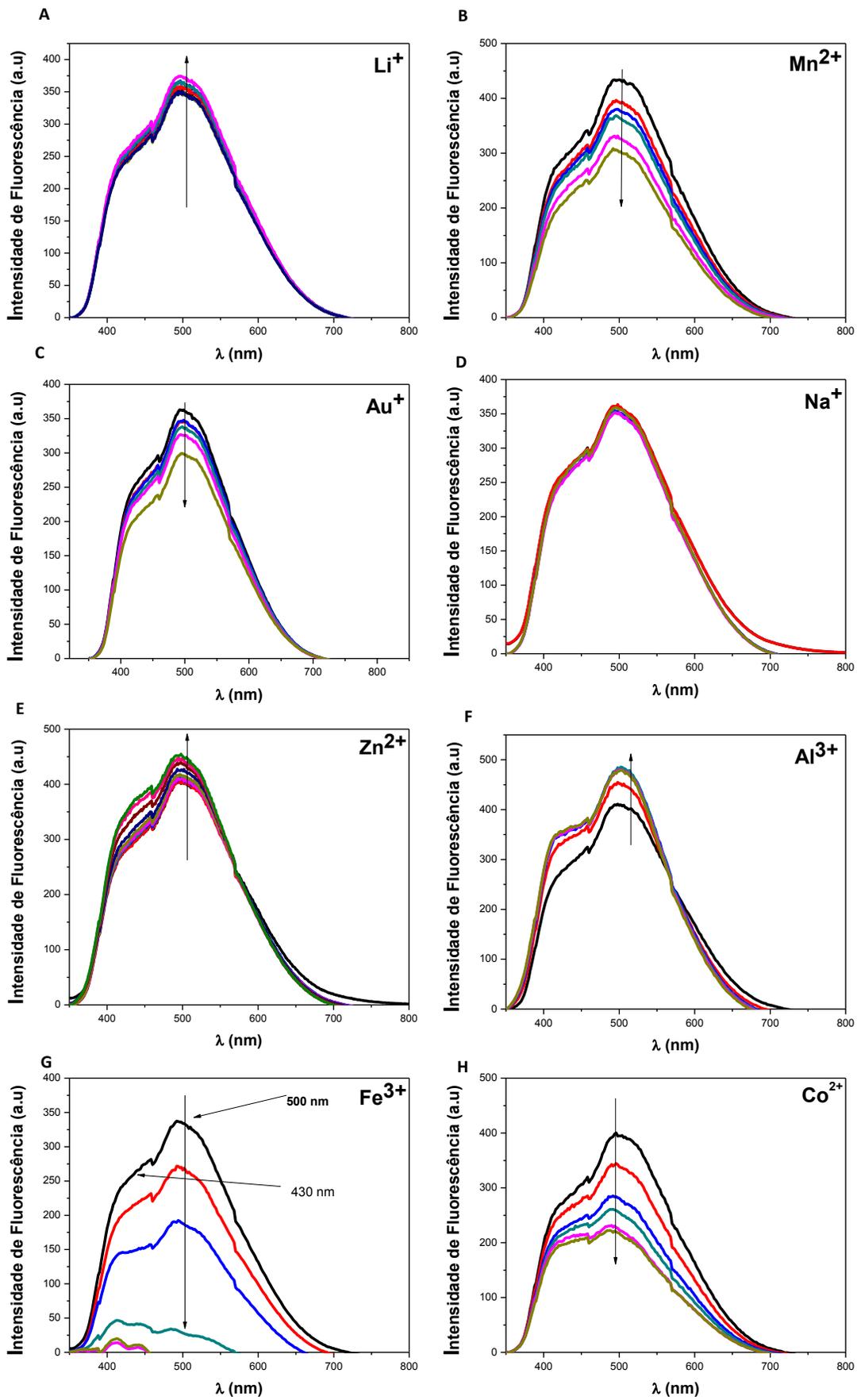


Figura S19. Absorbância vs comprimento de onda. À direita solução dos C-dots com os íons, à esquerda espectros dos cátions em solução. Li^+ (A), Mn^{2+} (B), Au^+ (C), Na^+ (D), Zn^{2+} (E), Al^{3+} (F), Fe^{3+} (G), Co^{2+} (H), In^{3+} (I), Ru^{3+} (J), Os^{3+} (K), Cu^{2+} (L), Ni^{2+} (M), Ag^+ (N), Pd^{2+} (O).



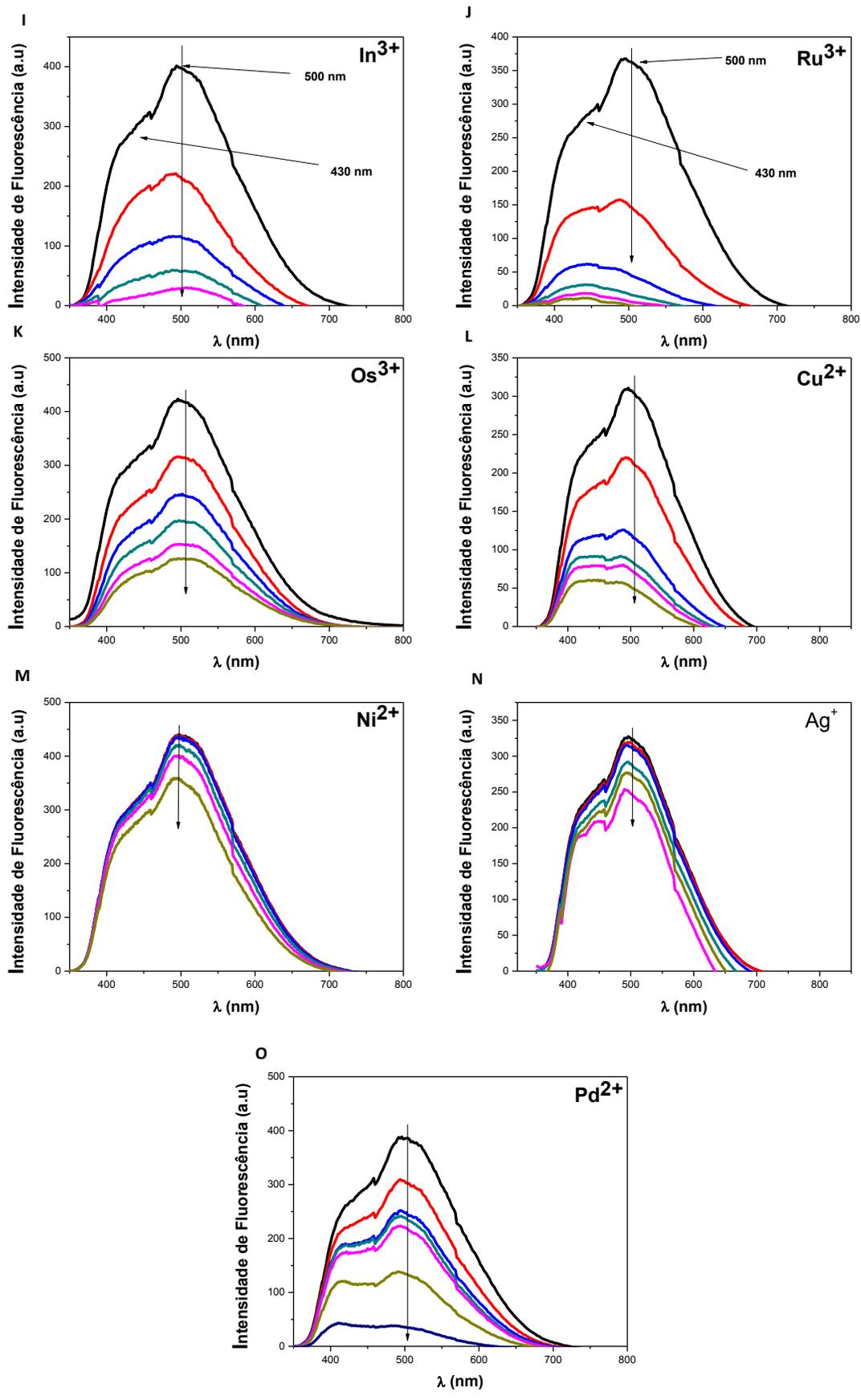


Figura S20. Intensidade de fluorescência vs comprimento de onda. Li^{+c} (A), Mn^{2+} (B), Au^{+c} (C), Na^{+} (D), Zn^{2+c} (E), Al^{3+c} (F), Fe^{3+c} (G), Co^{2+c} (H), In^{3+c} (I), Ru^{3+c} (J), Os^{3+} (K), Cu^{2+} (L), Ni^{2+} (M), Ag^{+} (N), Pd^{2+} (O).

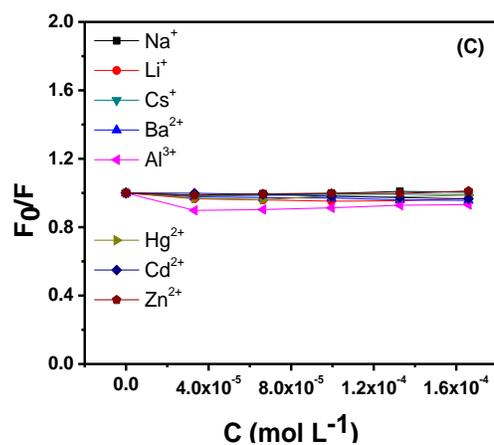


Figura S21. Gráficos de Stern-Volmer dos C-dots na presença de diferentes cátions metálicos, curva sem inclinação.

1.7 Espectros do Material Precipitado

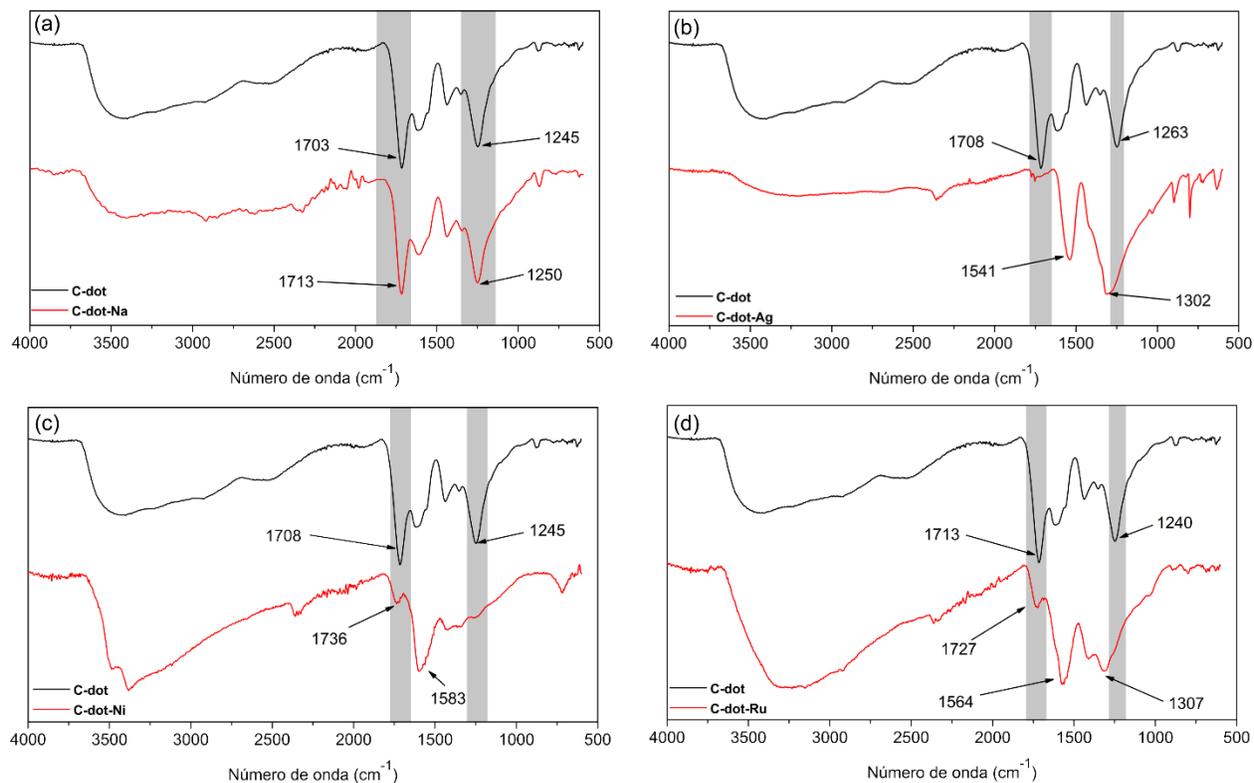


Figura S22. Espectros de IV dos C-dots em preto e dos compósitos C-dots com íons metálicos em vermelho. (a) Na^+ , (b) Ag^+ , (c) Ni^{2+} , (d) Ru^{3+} .

Referências

- (1) Edgar, A. In *Springer Handbook of Electronic and Photonic Materials*; Kasap, S., Capper, P., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017, p 1.
- (2) Kozák, O.; Sudolská, M.; Pramanik, G.; Cígler, P.; Otyepka, M.; Zbořil, R. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 4085.
- (3) Nicholas J. Turro, V. R., J.C. Scaiano *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*; University Science Books: California, 2010.
- (4) Douglas A. Skoog, F. J. H., Stanley R. Crouch *Princípios de Análise Instrumental*; Bookman: Porto Alegre, 2007.
- (5) Georgakilas, V.; Perman, J. A.; Tucek, J.; Zboril, R. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 4744.
- (6) Kitai, A. *Luminescent Materials and Applications*; John Wiley & Sons: West Sussex, 2008.
- (7) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence*; Springer: Maryland, 2010.
- (8) Sideri, I. K.; Voutyritsa, E.; Kokotos, C. G. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 4596.
- (9) Zielonka, J.; Kalyanaraman, B. *Free Radical Biology and Medicine* **2018**, *128*, 3.
- (10) Huang, J.; Xu, Z.; Cai, Z.; Guo, J.; Guo, J.; Shen, P.; Wang, Z.; Zhao, Z.; Ma, D.; Tang, B. Z. *Journal of Materials Chemistry C* **2019**, *7*, 330.
- (11) Cao, L.; Meziani, M. J.; Sahu, S.; Sun, Y.-P. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 171.
- (12) Carvalho, P. H. P. R., Universidade de Brasilia, 2014.
- (13) Lim, S. Y.; Shen, W.; Gao, Z. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 362.
- (14) Vendrell, M.; Zhai, D.; Er, J. C.; Chang, Y.-T. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4391.
- (15) Czarnik, A. W. *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*; ACS: Washington, DC, 1993.
- (16) Goldberg, M. C.; Weiner, E. R. In *Luminescence Applications*; American Chemical Society: 1989; Vol. 383, p 1.
- (17) O'Haver, T. C. *J. Chem. Educ.* **1978**, *55*, 423.
- (18) Zhou, J.-M.; Shi, W.; Xu, N.; Cheng, P. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 8082.
- (19) Whitehead, T. P.; Kricka, L. J.; Carter, T. J.; Thorpe, G. H. *Clin. Chem.* **1979**, *25*, 1531.
- (20) Lichtman, J. W.; Conchello, J.-A. *Nature Methods* **2005**, *2*, 910.
- (21) Baker, M. *Nature* **2010**, *466*, 1137.
- (22) Douglas B. Murphy, M. W. D. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*; Wiley-Blackwell: New Jersey, 2013.
- (23) Diaspro, A. *Optical Fluorescence Microscopy*; Springer: Genova, 2011.
- (24) Chyan, W.; Raines, R. T. *Acs Chemical Biology* **2018**, *13*, 1810.
- (25) Martinic, I.; Eliseeva, S. V.; Petoud, S. *J. Lumin.* **2017**, *189*, 19.
- (26) Pak, Y. L.; Swamy, K. M. K.; Yoon, J. *Sensors* **2015**, *15*, 24374.
- (27) Liu, J. N.; Bu, W. B.; Shi, J. L. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 6160.
- (28) Miao, Q. Q.; Pu, K. Y. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 2808.
- (29) Zhu, H.; Fan, J. L.; Du, J. J.; Peng, X. J. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 2115.
- (30) Cell Staining Toll -
- (31) Nadler, A.; Schultz, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 2408.
- (32) Tang, Y. H.; Lee, D. Y.; Wang, J. L.; Li, G. H.; Yu, J. H.; Lin, W. Y.; Yoon, J. Y. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5003.
- (33) Levi, L.; Mueller, T. J. J. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2825.
- (34) Yuan, L.; Lin, W. Y.; Zheng, K. B.; He, L. W.; Huang, W. M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 622.
- (35) Ueno, T.; Nagano, T. *Nature Methods* **2011**, *8*, 642.
- (36) Strianese, M.; Pellecchia, C. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *318*, 16.
- (37) H. R. C.; Schiffman, J. D.; Balakrishna, R. G. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *258*, 1191.

- (38) Luo, P. G.; Sahu, S.; Yang, S.-T.; Sonkar, S. K.; Wang, J.; Wang, H.; LeCroy, G. E.; Cao, L.; Sun, Y.-P. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2116.
- (39) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9*, 855.
- (40) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chemical Biology* **2008**, *3*, 142.
- (41) Johnsson, N.; Johnsson, K. *ACS Chemical Biology* **2007**, *2*, 31.
- (42) de Moliner, F.; King, A.; Dias, G. G.; de Lima, G. F.; de Simone, C. A.; da Silva Junior, E. N.; Vendrell, M. *Frontiers in Chemistry* **2018**, *6*, 339.
- (43) Shi, Z.; Han, Q.; Yang, L.; Yang, H.; Tang, X.; Dou, W.; Li, Z.; Zhang, Y.; Shao, Y.; Guan, L.; Liu, W. *Chem.-Eur. J.* **2015**, *21*, 290.
- (44) Oliveira, F. F. D.; Santos, D. C. B. D.; Lapis, A. A. M.; Corrêa, J. R.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; Moreira Jr, P. F.; de Oliveira, V. C.; Quina, F. H.; Neto, B. A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6001.
- (45) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; Vasconcelos, N. M. d.; Correa, J. R.; Costa, M. B.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1524.
- (46) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Mancilha, F. S.; Vasconcelos, I. B.; Thum, C.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Dupont, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4001.
- (47) D. Neto, B. A.; Corrêa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; Oliveira, H. C. B. d.; Fasciotti, M.; Eberlin, M. N.; Silva Jr., E. N. d. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 770.
- (48) da Cruz, E. H. G.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Silva, D. A. C.; Diogo, E. B. T.; de Souza Filho, J. D.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; de Oliveira, H. C. B.; Guido, B. C.; da Silva Filho, D. A.; Neto, B. A. D.; da Silva Junior, E. N. *New J. Chem.* **2014**, *38*, 2569.
- (49) Mota, A. A. R.; Carvalho, P. H. P. R.; Guido, B. C.; de Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Corrêa, J. R.; Neto, B. A. D. *Chemical Science* **2014**, *5*, 3995.
- (50) Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Gatto, C. C.; De Oliveira, H. C. B.; Soares, T. A.; Neto, B. A. D. *Chem.-Eur. J.* **2014**, *20*, 15360.
- (51) Mota, A. A. R.; Corrêa, J. R.; Carvalho, P. H. P. R.; de Sousa, N. M. P.; de Oliveira, H. C. B.; Gatto, C. C.; da Silva Filho, D. A.; de Oliveira, A. L.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2958.
- (52) Mota, A. A. R.; Correa, J. R.; de Andrade, L. P.; Assumpção, J. A. F.; de Souza Cintra, G. A.; Freitas-Junior, L. H.; da Silva, W. A.; de Oliveira, H. C. B.; Neto, B. A. D. *ACS Omega* **2018**, *3*, 3874.
- (53) Olzmann, J. A.; Carvalho, P. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2019**, *20*, 137.
- (54) Carvalho, T. O.; Carvalho, P. H. P. R.; Correa, J. R.; Guido, B. C.; Medeiros, G. A.; Eberlin, M. N.; Coelho, S. E.; Domingos, J. B.; Neto, B. A. D. *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 5118.
- (55) Garcia, L.; Lazzaretti, M.; Diguët, A.; Mussi, F.; Bisceglie, F.; Xie, J.; Pelosi, G.; Buschini, A.; Baigl, D.; Policar, C. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 3030.
- (56) Jiang, Q.; Zhang, Z.; Lu, J.; Huang, Y.; Lu, Z.; Tan, Y.; Jiang, Q. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7735.
- (57) Appelqvist, H.; Stranius, K.; Börjesson, K.; Nilsson, K. P. R.; Dyrager, C. *Bioconjugate Chemistry* **2017**, *28*, 1363.
- (58) Abe, A. M. M.; Helaja, J.; Koskinen, A. M. P. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4537.
- (59) Sun, X.; Zhai, W.; Fossey, J. S.; James, T. D. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 3456.
- (60) Wang, L.; Frei, M. S.; Salim, A.; Johnsson, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2770.
- (61) Hoye, A. T.; Davoren, J. E.; Wipf, P.; Fink, M. P.; Kagan, V. E. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 87.
- (62) Guo, X.; Wei, X.-R.; Sun, R.; Xu, Y.-J.; Chen, Y.; Ge, J.-F. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2019**.
- (63) Chakraborty, A.; Jana, N. R. *Journal of Physical Chemistry C* **2015**, *119*, 2888.
- (64) Yuan, H. S.; Cho, H.; Chen, H. H.; Panagia, M.; Sosnovik, D. E.; Josephson, L. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10361.
- (65) Hu, Z.; Sim, Y.; Kon, O. L.; Ng, W. H.; Ribeiro, A. J. M.; Ramos, M. J.; Fernandes, P. A.; Ganguly, R.; Xing, B. G.; Garcia, F.; Yeow, E. K. L. *Bioconjugate Chemistry* **2017**, *28*, 590.

- (66) Zielonka, J.; Joseph, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Ouari, O.; Vasquez-Vivar, J.; Cheng, G.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10043.
- (67) Neto, B. A. D.; Carvalho, P. H. P. R.; Santos, D. C. B. D.; Gatto, C. C.; Ramos, L. M.; de Vasconcelos, N. M.; Corrêa, J. R.; Costa, M. B.; de Oliveira, H. C. B.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1524.
- (68) Han, X.; Wang, Z. R.; Cheng, Q.; Meng, X. R.; Wei, D. H.; Zheng, Y. C.; Ding, J.; Hou, H. W. *Dyes and Pigments* **2017**, *145*, 576.
- (69) Shekhar, S.; Ryberg, P.; Hartwig, J. F.; Mathew, J. S.; Blackmond, D. G.; Strieter, E. R.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3584.
- (70) Lakowicz, J. *Principles of Fluorescent Spectroscopy*; 3rd ed.; Springer: New York, 2006.
- (71) Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319.
- (72) Chipem, F. A. S.; Mishra, A.; Krishnamoorthy, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8775.
- (73) Laurent, A. D.; Houari, Y.; Carvalho, P. H. P. R.; Neto, B. A. D.; Jacquemin, D. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 14189.
- (74) Mota, A. A. R. C., J. R.; Lopes, T. O.; de Oliveira, H. C. B.; Neto, B. A. D. *Revista Virtual de Química* **2015**, *7*, 357.
- (75) Lee, D.-C.; Jeong, Y.; Brownell, L. V.; Velasco, J. E.; Robins, K. A.; Lee, Y. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 24105.
- (76) Jiang, D.; Chen, S.; Xue, Z.; Li, Y.; Liu, H.; Yang, W.; Li, Y. *Dyes and Pigments* **2016**, *125*, 100.
- (77) Jadhav, T.; Dhokale, B.; Patil, Y.; Mobin, S. M.; Misra, R. *Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120*, 24030.
- (78) Li, Y.; Scudiero, L.; Ren, T.; Dong, W.-J. *J. Photochem. Photobiol., A* **2012**, *231*, 51.
- (79) Zhu, W.; Meng, X.; Yang, Y.; Zhang, Q.; Xie, Y.; Tian, H. *Chem.-Eur. J.* **2010**, *16*, 899.
- (80) Yousif, L. F.; Stewart, K. M.; Kelley, S. O. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1939.
- (81) Stauffer, W.; Sheng, H.; Lim, H. N. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 15764.
- (82) Neto, B. A. D.; Correa, J. R.; Silva, R. G. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 5291.
- (83) Roopa; Kumar, N.; Bhalla, V.; Kumar, M. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15614.
- (84) Xu, Z.; Xu, L. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1094.
- (85) Liu, P.; Li, S.; Jin, Y.; Qian, L.; Gao, N.; Yao, S. Q.; Huang, F.; Xu, Q.-H.; Cao, Y. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7*, 6754.
- (86) Li, M.; Nie, C.; Feng, L.; Yuan, H.; Liu, L.; Lv, F.; Wang, S. *Chemistry-an Asian Journal* **2014**, *9*, 3121.
- (87) Kreder, R.; Oncul, S.; Kucherak, O. A.; Pyrshev, K. A.; Real, E.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 22899.
- (88) Heek, T.; Nikolaus, J.; Schwarzer, R.; Fasting, C.; Welker, P.; Licha, K.; Herrmann, A.; Haag, R. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 153.
- (89) Koo, C. K.; Wong, K. L.; Man, C. W. Y.; Tam, H. L.; Tsao, S. W.; Cheah, K. W.; Lam, M. H. W. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 7501.
- (90) Turrens, J. F. *The Journal of Physiology* **2003**, *552*, 335.
- (91) Green, D. R. *Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.
- (92) Gomes, B. R. B.; Firmino, M.; Jorge, J. S.; Ferreira, M. L. O.; Rodovalho, T. M.; Weis, S. N.; Souza, G. E. P.; Morais, P. C.; Sousa, M. V.; Souza, P. E. N.; Veiga-Souza, F. H. *Free Radical Research* **2018**, *52*, 351.
- (93) I., D. S.; G., H. D. *Antioxidants & Redox Signaling* **2014**, *20*, 372.
- (94) In *Nanotechnology in Catalysis*.
- (95) *Nature Nanotechnology* **2014**, *9*, 737.
- (96) Böhm, S. *Nature Nanotechnology* **2014**, *9*, 741.

- (97) Bakry, R.; Vallant, R. M.; Najam-ul-Haq, M.; Rainer, M.; Szabo, Z.; Huck, C. W.; Bonn, G. K. *International journal of nanomedicine* **2007**, *2*, 639.
- (98) Hu, S.; Tian, F.; Bai, P.; Cao, S.; Sun, J.; Yang, J. *Materials Science and Engineering: B* **2009**, *157*, 11.
- (99) Rao, C. N. R.; Biswas, K.; Subrahmanyam, K. S.; Govindaraj, A. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2457.
- (100) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* **1985**, *318*, 162.
- (101) Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56.
- (102) Wallace, P. R. *Physical Review* **1947**, *71*, 622.
- (103) Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V.; Firsov, A. A. *Science* **2004**, *306*, 666.
- (104) Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12736.
- (105) Sun, Y.-P.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K. A. S.; Pathak, P.; Mezziani, M. J.; Harruff, B. A.; Wang, X.; Wang, H.; Luo, P. G.; Yang, H.; Kose, M. E.; Chen, B.; Veca, L. M.; Xie, S.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7756.
- (106) Baker, S. N.; Baker, G. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6726.
- (107) Himaja, A. L.; Karthik, P. S.; Singh, S. P. *The Chemical Record* **2015**, *15*, 595.
- (108) Zhu, S.; Song, Y.; Zhao, X.; Shao, J.; Zhang, J.; Yang, B. *Nano Research* **2015**, *8*, 355.
- (109) Strauss, V.; Margraf, J. T.; Dolle, C.; Butz, B.; Nacken, T. J.; Walter, J.; Bauer, W.; Peukert, W.; Spiecker, E.; Clark, T.; Guldi, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17308.
- (110) Kamegawa, K.; Nishikubo, K.; Kodama, M.; Adachi, Y.; Yoshida, H. *Carbon* **2002**, *40*, 1447.
- (111) Zheng, H.; Wang, Q.; Long, Y.; Zhang, H.; Huang, X.; Zhu, R. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10650.
- (112) Wang, J.; Wang, C.-F.; Chen, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 9297.
- (113) Ray, S. C.; Saha, A.; Jana, N. R.; Sarkar, R. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18546.
- (114) Sun, D.; Ban, R.; Zhang, P.-H.; Wu, G.-H.; Zhang, J.-R.; Zhu, J.-J. *Carbon* **2013**, *64*, 424.
- (115) Rodrigues, C. V.; Correa, J. R.; Aiube, C. M.; Andrade, L. P.; Galvão, P. M.; Costa, P. A.; Campos, A. L.; Pereira, A. J.; Ghesti, G. F.; Felix, J. F.; Weber, I. T.; Neto, B. A.; Rodrigues, M. O. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 2623.
- (116) D'Angelis do E. S. Barbosa, C.; Corrêa, J. R.; Medeiros, G. A.; Barreto, G.; Magalhães, K. G.; de Oliveira, A. L.; Spencer, J.; Rodrigues, M. O.; Neto, B. A. D. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21*, 5055.
- (117) Alves, J. A. C.; Freire, C.; de Castro, B.; Figueiredo, J. L. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, *189*, 75.
- (118) Georgakilas, V.; Otyepka, M.; Bourlinos, A. B.; Chandra, V.; Kim, N.; Kemp, K. C.; Hobza, P.; Zboril, R.; Kim, K. S. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6156.
- (119) Liu, X.; Pang, J.; Xu, F.; Zhang, X. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 31100.
- (120) Tian, L.; Ghosh, D.; Chen, W.; Pradhan, S.; Chang, X.; Chen, S. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2803.
- (121) Zhang, Z.; Shi, Y.; Pan, Y.; Cheng, X.; Zhang, L.; Chen, J.; Li, M.-J.; Yi, C. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 5020.
- (122) Krishna, A. S.; Radhakumary, C.; Antony, M.; Sreenivasan, K. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 8626.
- (123) Wang, F.; Pang, S.; Wang, L.; Li, Q.; Kreiter, M.; Liu, C.-y. *Chemistry of Materials* **2010**, *22*, 4528.
- (124) Yang, X.-D.; Xiang, H.-J.; An, L.; Yang, S.-P.; Liu, J.-G. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 800.
- (125) Wang, X.; Cao, L.; Lu, F.; Mezziani, M. J.; Li, H.; Qi, G.; Zhou, B.; Harruff, B. A.; Kermarrec, F.; Sun, Y.-P. *Chem. Commun.* **2009**, 3774.
- (126) Gupta, V.; Chaudhary, N.; Srivastava, R.; Sharma, G. D.; Bhardwaj, R.; Chand, S. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 9960.

- (127) Wang, X.; Wang, D.; Guo, Y.; Yang, C.; Iqbal, A.; Liu, W.; Qin, W.; Yan, D.; Guo, H. *Dalton Transactions* **2015**, 44, 5547.
- (128) Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P. *Small* **2008**, 4, 455.
- (129) Wang, B.; Tang, W.; Lu, H.; Huang, Z. *J. Mater. Sci.* **2015**, 50, 5411.
- (130) Wang, S.; Cole, I. S.; Zhao, D.; Li, Q. *Nanoscale* **2016**, 8, 7449.
- (131) Feng, Y.; Zhao, J.; Yan, X.; Tang, F.; Xue, Q. *Carbon* **2014**, 66, 334.
- (132) Pei, S.; Cheng, H.-M. *Carbon* **2012**, 50, 3210.
- (133) Gao, W.; Alemany, L. B.; Ci, L.; Ajayan, P. M. *Nat Chem* **2009**, 1, 403.
- (134) Gao, W.; Alemany, L. B.; Ci, L.; Ajayan, P. M. *Nature Chemistry* **2009**, 1, 403.
- (135) Chua, C. K.; Pumera, M. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 291.
- (136) Hummers, W. S.; Offeman, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 1339.
- (137) Sun, H.; Wu, L.; Gao, N.; Ren, J.; Qu, X. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, 5, 1174.
- (138) Shen, R.; Song, K.; Liu, H.; Li, Y.; Liu, H. *ChemPhysChem* **2012**, 13, 3549.
- (139) Wang, J.; Qiu, J. *J. Mater. Sci.* **2016**, 51, 4728.
- (140) Ding, C.; Zhu, A.; Tian, Y. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 20.
- (141) Li, H.; Zhang, Y.; Wang, L.; Tian, J.; Sun, X. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 961.
- (142) Sun, X.-Y.; Wu, L.-L.; Shen, J.-S.; Cao, X.-G.; Wen, C.; Liu, B.; Wang, H.-Q. *RSC Adv.* **2016**, 6, 97346.
- (143) Hu, S.-L.; Niu, K.-Y.; Sun, J.; Yang, J.; Zhao, N.-Q.; Du, X.-W. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, 19, 484.
- (144) Zhou, J.; Booker, C.; Li, R.; Zhou, X.; Sham, T.-K.; Sun, X.; Ding, Z. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 744.
- (145) Wang, Y.; Kalytchuk, S.; Zhang, Y.; Shi, H.; Kershaw, S. V.; Rogach, A. L. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, 5, 1412.
- (146) Wang, Y.; Hu, A. *Journal of Materials Chemistry C* **2014**, 2, 6921.
- (147) Wang, Y.; Dong, L.; Xiong, R.; Hu, A. *Journal of Materials Chemistry C* **2013**, 1, 7731.
- (148) Zhao, Q.-L.; Zhang, Z.-L.; Huang, B.-H.; Peng, J.; Zhang, M.; Pang, D.-W. *Chemical Communications* **2008**, 5116.
- (149) Haase, M.; Schäfer, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 5808.
- (150) Ke, J.; Li, X.; Zhao, Q.; Liu, B.; Liu, S.; Wang, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 496, 425.
- (151) Wen, X.; Yu, P.; Toh, Y.-R.; Ma, X.; Tang, J. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 4703.
- (152) Chowdhury, I.; Duch, M. C.; Mansukhani, N. D.; Hersam, M. C.; Bouchard, D. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47, 6288.
- (153) Zhou, Y.; Benetti, D.; Tong, X.; Jin, L.; Wang, Z. M.; Ma, D.; Zhao, H.; Rosei, F. *Nano Energy* **2018**, 44, 378.
- (154) Chen, K. L.; Elimelech, M. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, 309, 126.
- (155) Saleh, N. B.; Pfefferle, L. D.; Elimelech, M. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 7963.
- (156) Smith, B.; Wepasnick, K.; Schrote, K. E.; Bertele, A. R.; Ball, W. P.; O'Melia, C.; Fairbrother, D. H. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, 43, 819.
- (157) Wang, N.; Liu, Z. X.; Li, R. S.; Zhang, H. Z.; Huang, C. Z.; Wang, J. *J. Mater. Chem. B.* **2017**, 5, 6394.
- (158) Wu, L.; Liu, L.; Gao, B.; Muñoz-Carpena, R.; Zhang, M.; Chen, H.; Zhou, Z.; Wang, H. *Langmuir* **2013**, 29, 15174.
- (159) Bayati, M.; Dai, J.; Zambrana, A.; Rees, C.; Fidalgo de Cortalezzi, M. *Journal of Environmental Sciences* **2018**, 65, 223.
- (160) Chandra, S.; Das, P.; Bag, S.; Laha, D.; Pramanik, P. *Nanoscale* **2011**, 3, 1533.
- (161) Konkena, B.; Vasudevan, S. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, 3, 867.

- (162) Medhekar, N. V.; Ramasubramaniam, A.; Ruoff, R. S.; Shenoy, V. B. *ACS Nano* **2010**, *4*, 2300.
- (163) Rapacioli, M.; Calvo, F.; Spiegelman, F.; Joblin, C.; Wales, D. J. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 2487.
- (164) Stefan, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3430.
- (165) Pérez, E. M.; Martín, N. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6425.
- (166) Grimme, S.; Mück-Lichtenfeld, C.; Antony, J. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 11199.
- (167) Sharma, A.; Gadly, T.; Neogy, S.; Ghosh, S. K.; Kumbhakar, M. *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 5861.
- (168) Heidenreich, R. D.; Hess, W. M.; Ban, L. L. *J. Appl. Crystallogr.* **1968**, *1*, 1.
- (169) Cao, L.; Wang, X.; Meziani, M. J.; Lu, F.; Wang, H.; Luo, P. G.; Lin, Y.; Harruff, B. A.; Veca, L. M.; Murray, D.; Xie, S.-Y.; Sun, Y.-P. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 11318.
- (170) Bai, W.; Zheng, H.; Long, Y.; Mao, X.; Gao, M.; Zhang, L. *Analytical Sciences* **2011**, *27*, 243.
- (171) Liu, C.; Zhang, P.; Tian, F.; Li, W.; Li, F.; Liu, W. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 13163.
- (172) Shi, W.; Li, X.; Ma, H. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 6432.
- (173) Kong, W.; Liu, R.; Li, H.; Liu, J.; Huang, H.; Liu, Y.; Kang, Z. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 5077.
- (174) Liu, J.-H.; Cao, L.; LeCroy, G. E.; Wang, P.; Meziani, M. J.; Dong, Y.; Liu, Y.; Luo, P. G.; Sun, Y.-P. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7*, 19439.
- (175) Kiran, S.; Misra, R. D. K. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2015**, *103*, 2888.
- (176) Liu, S.-S.; Wang, C.-F.; Li, C.-X.; Wang, J.; Mao, L.-H.; Chen, S. *Journal of Materials Chemistry C* **2014**, *2*, 6477.
- (177) Li, H.; Liu, R.; Kong, W.; Liu, J.; Liu, Y.; Zhou, L.; Zhang, X.; Lee, S.-T.; Kang, Z. *Nanoscale* **2014**, *6*, 867.
- (178) Li, H.; Liu, R.; Lian, S.; Liu, Y.; Huang, H.; Kang, Z. *Nanoscale* **2013**, *5*, 3289.
- (179) Han, Y.; Huang, H.; Zhang, H.; Liu, Y.; Han, X.; Liu, R.; Li, H.; Kang, Z. *ACS Catalysis* **2014**, *4*, 781.
- (180) Liu, H.; Ye, T.; Mao, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6473.
- (181) Sharma, A.; Gadly, T.; Neogy, S.; Ghosh, S. K.; Kumbhakar, M. *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 1044.
- (182) Kumar, P.; Karmakar, S.; Bohidar, H. B. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 15113.
- (183) Moulder, J. F. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*; Perkin-Elmer Corporation: Minnesota, 1992.
- (184) Strelko, V.; Malik, D. J.; Streat, M. *Carbon* **2002**, *40*, 95.
- (185) Pan, D.; Guo, L.; Zhang, J.; Xi, C.; Xue, Q.; Huang, H.; Li, J.; Zhang, Z.; Yu, W.; Chen, Z.; Li, Z.; Wu, M. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 3314.
- (186) Pan, D.; Zhang, J.; Li, Z.; Wu, M. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 734.
- (187) Dekaliuk, M. O.; Viagin, O.; Malyukin, Y. V.; Demchenko, A. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 16075.
- (188) Fu, M.; Ehrat, F.; Wang, Y.; Milowska, K. Z.; Reckmeier, C.; Rogach, A. L.; Stolarczyk, J. K.; Urban, A. S.; Feldmann, J. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 6030.
- (189) Xiao, J.; Liu, P.; Li, L.; Yang, G. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 2239.
- (190) Gong, X.; Hu, Q.; Paaui, M. C.; Zhang, Y.; Shuang, S.; Dong, C.; Choi, M. M. F. *Nanoscale* **2014**, *6*, 8162.
- (191) Scaiano, N. J. T. V. R. J. C. *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*; University Science Books: Sausalito, California, 2010.
- (192) Dutta Choudhury, S.; Chethodil, J. M.; Gharat, P. M.; P. K, P.; Pal, H. *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 1389.
- (193) Motoo, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1959**, *32*, 429.
- (194) Hu, S.; Wang, Y.; Zhang, W.; Chang, Q.; Yang, J. *Materials (Basel)* **2017**, *10*, 165.

- (195) Chen, S.; Yu, Y.-L.; Wang, J.-H. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *999*, 13.
- (196) Wu, Z. L.; Liu, Z. X.; Yuan, Y. H. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 3794.
- (197) Liu, M. L.; Chen, B. B.; Li, C. M.; Huang, C. Z. *Green Chem.* **2019**, *21*, 449.
- (198) Hunter, R. J. *Electrokinetics and the Zetapotential. Foundations of Colloid Science*; Oxford University Press Inc: Nova York, 2001; Vol. 2.
- (199) Bhattacharjee, S. J. *Controlled Release* **2016**, *235*, 337.
- (200) Dukhin, S. S. D., B.V. *Non-equilibrium Double Layer and Electrokinetic Phenomena. In Surface and Colloid Science*; J. Wiley & Sons: Nova York, 1974; Vol. 7.
- (201) Gumustas, M.; Sengel-Turk, C. T.; Gumustas, A.; Ozkan, S. A.; Uslu, B. In *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*; Grumezescu, A. M., Ed.; Elsevier: 2017, p 67.
- (202) Patel, V. R.; Agrawal, Y. K. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2011**, *2*, 81.
- (203) Mukherjee, S.; Prasad, E.; Chadha, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 7288.
- (204) Habiba, K.; Makarov, V. I.; Avalos, J.; Guinel, M. J. F.; Weiner, B. R.; Morell, G. *Carbon* **2013**, *64*, 341.
- (205) Grabowski, Z. R.; Rotkiewicz, K.; Rettig, W. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899.
- (206) Deng, L.; Wang, X.; Kuang, Y.; Wang, C.; Luo, L.; Wang, F.; Sun, X. *Nano Research* **2015**, *8*, 2810.
- (207) Napper, D. H. *Product R&D* **1970**, *9*, 467.
- (208) Shen, L.; Chen, M.; Hu, L.; Chen, X.; Wang, J. *Langmuir* **2013**, *29*, 16135.
- (209) Zhuo, Y.; Zhong, D.; Miao, H.; Yang, X. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 32669.
- (210) Huang, H.; Liao, L.; Xu, X.; Zou, M.; Liu, F.; Li, N. *Talanta* **2013**, *117*, 152.
- (211) Kraemer, E. O.; Dexter, S. T. *The Journal of Physical Chemistry* **1926**, *31*, 764.
- (212) Li, D.; Müller, M. B.; Gilje, S.; Kaner, R. B.; Wallace, G. G. *Nature Nanotechnology* **2008**, *3*, 101.
- (213) Verwey, E. J. W. *J. Phys. Colloid. Chem.* **1947**, *51*, 631.
- (214) Ciotta, E. P., S.; Richetta, M.; Proposito, P.; Tagliatesta, P.; Lorecchio, C.; Venditti, I.; Fratoddi, I.; Casciardi, S.; Pizzoferrato, R. *Sensors* **2017**, *17*, 2614.
- (215) Wang, F.; Gu, Z.; Lei, W.; Wang, W.; Xia, X.; Hao, Q. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *190*, 516.
- (216) Sun, L.; Hao, D.; Shen, W.; Qian, Z.; Zhu, C. *Microchimica Acta* **2012**, *177*, 357.
- (217) Juan, X.; Sushant, S.; Li, C.; Parambath, A.; N., T. K.; Haijun, Q.; E., B. C.; A., G. E.; Alexander, P.; Ya-Ping, S. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 3604.
- (218) Poulin, B. A.; Ryan, J. N.; Aiken, G. R. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 10098.
- (219) Plaza, C.; Brunetti, G.; Senesi, N.; Polo, A. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 917.
- (220) Boaz, H.; Rollefson, G. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 3435.